

Bruna Soares de Souza

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP EM  
RATAS SHR, SLA16 E WISTAR: INFLUÊNCIA DE FATORES  
GENÉTICOS E AMBIENTAIS EM UM MODELO ANIMAL DA  
DOENÇA DE PARKINSON**

Trabalho de Conclusão de Curso  
submetido ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Santa Catarina como requisito parcial  
para a obtenção do Grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel  
Prediger

Coorientadora: MSc. Angela Patricia  
França

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca  
Universitária da UFSC.

de Souza, Bruna Soares  
Efeitos da administração intranasal de MPTP em  
ratas Wistar, SHR e SLA16 : Influências de fatores  
genéticos e ambientais em um modelo animal da doença  
de Parkinson / Bruna Soares de Souza ; orientador,  
Professor Rui D.S. Prediger, coorientador, MSc.  
Angela Patricia França, 2018.  
93 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. doença de Parkinson. 3.  
depressão. 4. fêmeas. 5. intranasal. I. Prediger,  
Professor Rui D.S.. II. França, MSc. Angela Patricia  
. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.





Este trabalho é dedicado aos meus pais  
Leomar A. de Souza e Susana A. S. de Souza.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Professor Rui Daniel Prediger por ter me aceitado no laboratório quando eu ainda estava no início do curso, e agora pela orientação no Trabalho de Conclusão de Curso. Com certeza seus ensinamentos contribuíram muito para a minha formação científica.

A MSc. Angela P. França que coorientou este trabalho. Meus agradecimentos por todas as sugestões e discussões científicas desde a elaboração do protocolo experimental até a discussão dos resultados. Esses anos de convívio como IC e coorientanda me fizeram crescer tanto no âmbito pessoal quanto no âmbito científico. A você meu muito obrigada!

Ao Professor Geison S. Izidio e a todos os integrantes do Laboratório de Genética do Comportamento (LGC), por terem aceitado nossa proposta de projeto e concedido as linhagens isogênicas para a realização deste trabalho, e por todas as discussões científicas a respeito das linhagens SHR e SLA16.

A MSc. Katiane Roversi pela disposição em auxiliar na administração da toxina nos animais.

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas Diurno, por toda a dedicação e por compartilharem com os seus alunos um pouco do seu conhecimento.

Gostaria de agradecer a todos os colegas do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON) com quem convivi desde 2015: Ana Elisa, Andreia, Angela, Filipe, Gislaíne, Josiel, Katiane, Marcelo, Marina, Marissa, Samantha e Tuane. Muito obrigada por todos os ensinamentos pessoais e científicos. Obrigada por terem me chamado para ajudá-los nos seus experimentos, esse trabalho não seria a metade do que ele é sem a influência e ensinamentos de vocês.

Agradeço ao Professor Marcelo Farina por toda a ajuda na análises estatísticas, e por dispor do seu tempo para esclarecer as minhas dúvidas.

Agradeço ao corpo técnico do LAMEB por todo o suporte para a realização de alguns experimentos.

As amigas que a Graduação me proporcionou: Ariel, Bruna Vieira, Bárbara, Giovanna, Julia e Monique. Conhecer vocês e conviver diariamente (e em alguns casos esporadicamente) fez toda a diferença dentro do curso e eu pude aprender um pouco com cada uma de vocês.

Aos meus amigos que ficaram em Joinville, Heloiza, Matheus e Pedro. Obrigada pelo apoio mesmo que distante e por todos os momentos que tivemos quando estávamos juntos.

Ao meu namorado Diego Franzoi por todo o companheirismo, suporte e compreensão nesses anos de relacionamento, principalmente neste último semestre, teria sido mais difícil sem você.

Agradecer principalmente e acima de tudo aos meus pais que sempre se dedicaram para me oferecer a melhor Educação e por me ensinarem desde pequena a importância do conhecimento e onde ele pode nos levar. Por terem aceitado o desafio de ter uma filha morando longe de casa. Por isso e por todo o suporte financeiro, a vocês minha eterna gratidão. Esse trabalho não teria acontecido sem vocês.

A CAPES e CNPQ pelo suporte financeiro.



“Home is behind, the world ahead  
and there are many paths to thread  
through shaddows to the edge of night  
until the stars are all alight.”  
(Pippin’s song – Lord of the Rings: The Return of  
the King).

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada, principalmente, pela morte dos neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal, que acarreta no aparecimento dos sintomas motores clássicos da doença. Além do sistema dopaminérgico, outros sistemas de neurotransmissão também são acometidos na DP, sendo responsáveis pelos sintomas não motores, como hiposmia, alterações gastrointestinais, distúrbios de sono, prejuízos de memória, ansiedade e depressão. Dentre estes sintomas, os transtornos de humor acometem ao menos 50% dos pacientes, principalmente em mulheres, e acabam por aumentar os custos do tratamento da DP e diminuir a qualidade de vida do paciente. Além disso, transtornos de humor desenvolvidos durante a vida adulta podem aumentar o risco do desenvolvimento da DP. O MPTP é uma das neurotoxinas utilizadas para mimetizar os sintomas da DP em modelos animais, induzindo a lesão dos neurônios dopaminérgicos e o aparecimento de alterações comportamentais e neuroquímicas semelhantes àsquelas observadas na DP. A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), é um modelo animal genético utilizado para estudos de emocionalidade e do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Esta linhagem apresenta hipofunção dopaminérgica em regiões corticais e estriatais, responsáveis por suas alterações comportamentais e prejuízos cognitivos e trabalhos prévios demonstraram uma alteração na susceptibilidade de ratos SHR as alterações comportamentais induzidas pela reserpina e 6-OHDA (modelos animais da DP). A partir da linhagem SHR e Lewis (outro modelo animal genético utilizado no estudo de emocionalidade), identificou-se um QTL no cromossomo 4 dessas linhagens, nomeado *Anxiety related response 16*, responsável pelo comportamento contrastante das linhagens em testes que avaliavam parâmetros de ansiedade. Afim de se estudar a influência desta região genômica, foi desenvolvida a linhagem SLA16 que possui o genoma idêntico a linhagem SHR, com exceção de uma porção do cromossomo 4 onde está inserido o QTL da linhagem Lewis. Estudos já demonstraram algumas diferenças comportamentais entre as linhagens SHR e SLA16 em parâmetros de locomoção e ansiedade, mas não foi observada nenhuma diferença no perfil dopaminérgico entre as duas linhagens. No presente trabalho hipotetizamos que esta região cromossômica diferencial das linhagens SHR e SLA16 pode aumentar a susceptibilidade destas linhagens aos efeitos comportamentais e neuroquímicos induzidos pela

administração intranasal (i.n.) de MPTP, em comparação a linhagem controle Wistar. Os resultados do presente estudo indicam que ratas das linhagens apresentam diferentes perfis de emocionalidade, sendo que as linhagens isogênicas SHR e SLA16 apresentam menor perfil tipo-ansioso e maior perfil tipo-depressivo e anedônico em comparação a linhagem Wistar. A administração i.n. de MPTP não alterou nenhum dos parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratas Wistar, enquanto apresentou uma tendência em reduzir o tempo de nado em ratas SHR. De maneira interessante, ratas da linhagem SLA16 tratadas com MPTP apresentaram comportamentos do tipo-depressivo no teste do nado forçado e prejuízos de memória de procedimento na tarefa do labirinto aquático. Ratas SHR apresentaram expressão reduzida de DAT no estriado em relação a linhagem Wistar. outras duas linhagens. Apesar destas diferenças comportamentais, não foram observadas alterações no imunoconteúdo da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado (usado como marcador de neurônios dopaminérgicos) no 21º dia após a administração i.n. de MPTP. Estes resultados indicam que a linhagem SLA16 foi mais susceptível as alterações de emocionalidade e cognitivas induzidas pela administração i.n. de MPTP, indicando que pode haver influência da região genômica diferencial nos efeitos da toxina, uma vez que não observamos estas alterações na linhagem SHR.

**Palavras-chave:** doença de Parkinson, depressão, fêmeas, MPTP intranasal, SHR, SLA16.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração das alterações celulares observadas na DP.....	23
Figura 2 - Ilustração dos principais agentes farmacológicos utilizados para a indução de modelos animais da DP. ....	27
Figura 3 - Biotransformação da pró-neurotoxina MPTP em MPP+.....	31
Figura 4 - Protocolo de Administração i.n. de MPTP e testes comportamentais. ....	44
Figura 5 - Representação do teste de reconhecimento de objeto.....	46
Figura 6 - Aparato utilizado para a realização do teste do LCE.....	47
Figura 7 - Representação do teste do nado forçado e os parâmetros relacionados à depressão analisados.....	48
Figura 8 - Representação da disposição dos bebedouros ao longo do teste do consumo de sacarose.....	49
Figura 9 - Ilustração do teste do labirinto aquático e as coordenadas do tanque. ....	50
Figura 10 - Representação do teste da borrifada de sacarose.....	51
Figura 11 - Diferenças entre as linhagens e avaliação do efeito da administração i.n. de MPTP sobre os parâmetros de locomoção e ansiedade avaliados no teste do campo aberto. ....	54
Figura 12 - Tempo de exploração dos objetos na sessão de treino no teste do reconhecimento de objetos.....	55
Figura 13 - Diferenças entre as linhagens e avaliação do efeito da administração i.n. de MPTP no teste de reconhecimento do objeto.....	56
Figura 14 - Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre os comportamentos relacionados à ansiedade em ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 avaliados no teste do LCE. ....	58

Figura 15 - Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre os comportamentos relacionados à depressão em ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 avaliados no teste do NF..... 60

Figura 16 - Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre os comportamentos relacionados à anedonia em ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 avaliados no teste do CS..... 62

Figura 17 - - Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a memória de procedimento em ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 avaliados no teste do labirinto aquático..... 63

Figura 18 - Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a memória de procedimento em ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 avaliados separadamente no teste do labirinto aquático..... 64

Figura 19 - Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre os comportamentos relacionados à anedonia e autocuidado em ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 avaliados no teste da borrifada de sacarose..... 66

Figura 20 - Efeito da administração i.n. de MPTP sobre o imunoconteúdo e TH e DAT no estriado das linhagens..... 68

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sumário dos estudos que investigaram a influência do gênero e/ou estrogênio na susceptibilidade aos efeitos do MPTP em roedores	28
Quadro 2 - Sumário dos resultados de trabalhos prévios que compararam as linhagens SLA16 e SHR. ....	35
Quadro 3 - Grupos experimentais obtidos com o protocolo de administração i.n. de MPTP .....	44
Quadro 4 - Proteínas quantificadas pela técnica de <i>western blotting</i> ....	52





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA – 6-hidroxidopamina  
BHE – Barreira Hematoencefálica  
BS – Borrifada de Sacarose  
CA – Campo Aberto  
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais  
CS – Consumo de Sacarose  
DA – Dopamina  
DAT – Transportador de Dopamina  
DP – Doença de Parkinson  
DO – Discriminação Olfatória  
EROs- Espécies Reativas de Oxigênio  
H2O – Água  
I.N. – Intranasal  
LCE – Labirinto em Cruz Elevado  
LEW – Linhagem de ratos Lewis  
MAO-B – Monoamina Oxidase B  
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina  
NF – Nado Forçado  
QTL – *Loci* de característica quantitativa (*Quantitative Trait Loci*)  
RO – Reconhecimento do Objeto  
SAC – Sacarose  
SHR – Linhagem de ratos espontaneamente hipertensos  
SLA16 – SHR.LEW.*Anxrr16*  
SN – Substância Negra  
SNpc – Substância Negra parte compacta  
TDAH – Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade  
TH – Tirosina Hidroxilase  
VMAT – Transportador Vesicular de Monoaminas



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
2.1	UM BREVE HISTÓRICO SOBRE A DOENÇA DE PARKINSON .....	19
2.2	FISIOPATOLOGIA DA DP .....	19
2.3	SINTOMAS NÃO MOTORES DA DP .....	23
2.4	MODELOS ANIMAIS DA DP .....	26
<b>2.4.1</b>	<b>O modelo do MPTP.....</b>	<b>31</b>
2.5	AS LINHAGENS SHR E SLA16 .....	33
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>42</b>
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>6</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6.1	ANIMAIS.....	43
6.2	DESENHO EXPERIMENTAL .....	43
6.3	ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP .....	44
6.4	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	45
<b>6.4.1</b>	<b>Teste do Campo Aberto (CA).....</b>	<b>45</b>
<b>6.4.2</b>	<b>Teste do reconhecimento de objeto (RO) .....</b>	<b>45</b>
<b>6.4.3</b>	<b>Teste do labirinto em cruz elevado (LCE) .....</b>	<b>46</b>
<b>6.4.4</b>	<b>Teste do nado forçado (NF).....</b>	<b>47</b>
<b>6.4.5</b>	<b>Teste de consumo de sacarose (CS) .....</b>	<b>48</b>
<b>6.4.6</b>	<b>Labirinto aquático (versão memória de procedimento) ..</b>	<b>49</b>
<b>6.4.7</b>	<b>Teste da borrifada de sacarose (BS) .....</b>	<b>50</b>
6.5	ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	51
<b>6.5.1</b>	<b>Preparo das amostras .....</b>	<b>51</b>
<b>6.5.2</b>	<b>Imunodeteccção de Proteínas (<i>Western blotting</i>).....</b>	<b>51</b>
6.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	52

<b>7</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>7.1</b>	<b>TESTES COMPORTAMENTAIS .....</b>	<b>53</b>
<b>7.1.1</b>	<b>Teste do Campo Aberto.....</b>	<b>53</b>
<b>7.1.2</b>	<b>Teste de reconhecimento de objetos .....</b>	<b>54</b>
<b>7.1.3</b>	<b>Teste do labirinto em cruz elevada.....</b>	<b>56</b>
<b>7.1.4</b>	<b>Teste do nado forçado.....</b>	<b>59</b>
<b>7.1.5</b>	<b>Teste do consumo de sacarose.....</b>	<b>61</b>
<b>7.1.6</b>	<b>Labirinto aquático – versão memória de procedimento..</b>	<b>62</b>
<b>7.1.7</b>	<b>Teste da Borrifada de Sacarose .....</b>	<b>65</b>
<b>7.2</b>	<b>ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....</b>	<b>67</b>
<b>7.2.1</b>	<b>Imunoconteúdo de tirosina hidroxilase (TH) e transportador de dopamina (DAT) no estriado .....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP), descrita em 1817 por James Parkinson (DP), é uma doença neurodegenerativa que acomete principalmente os neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. Além da morte neuronal, são encontrados nos encéfalos de pacientes com a DP agregados proteicos, compostos em sua maioria pelo acúmulo da proteína  $\alpha$ -sinucleína. Estes agregados proteicos são chamados de Corpos de Lewy (PARKINSON 2002; PRZDEDBORSKI 2017).

A morte dos neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal e a consequente redução dos níveis de dopamina (DA) no estriado representam as bases neurobiológicas para o aparecimento dos sintomas motores da DP, caracterizados por bradicinesia, rigidez e tremor de repouso (SCHAPIRA, CHAUDHURI & JENNER, 2017). No entanto, a DA não é o único neurotransmissor envolvido na DA. A presença dos corpos de Lewy em diversas regiões encefálicas e alterações em outros sistemas de neurotransmissão (serotoninérgicos, noradrenérgicos, colinérgicos, etc), estão envolvidas no surgimento dos sintomas não motores da DP, que podem surgir em diferentes estágios da doença, inclusive antes do aparecimento dos sintomas motores clássicos (CHAUDHURI, HEALY & SCHAPIRA, 2006; SCHAPIRA, CHAUDHURI & JENNER, 2017).

A DP pode ter etiologia genética, o que reflete em 10% dos casos, enquanto a grande maioria tem etiologia idiopática com grande participação de fatores ambientais (POEWE et al., 2017). Entre os principais mecanismos envolvidos com a patogênese da DP estão a disfunção mitocondrial, decorrente da redução da atividade do complexo I mitocondrial, aumento do estresse oxidativo, alteração da homeostase do íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), comprometimento do sistema ubiquitina-proteossoma, excitotoxicidade glutamatérgica e neuroinflamação (ANDERSEN, 2004; SURMEIER et al., 2011; DIAS, JUNN & MOURADIAN, 2013; NIRANJAN, 2014; GOSWANI, JOSHI & SINGH, 2017).

Os modelos animais da DP, sejam eles genéticos ou induzidos por neurotoxinas, são de extrema importância para a melhor compreensão da patologia e possíveis avanços na identificação de novos alvos terapêuticos e tratamentos. Diversas toxinas são utilizadas para mimetizar as alterações moleculares e os sintomas motores e não motores observados na DP, destacando-se: a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), rotenona, reserpina e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

(MPTP) (GUBELLINI & KACHIDIAN, 2015; DAWSON, GOLE & LAGIER-TOURENNE, 2018).

Muitos trabalhos mostram diferenças na susceptibilidade às toxinas entre machos e fêmeas em modelos animais, no entanto ainda não existe um consenso. Enquanto alguns trabalhos demonstram que fêmeas com níveis fisiológicos de estrogênio são resistentes aos efeitos das toxinas, outros mostram que as mesmas são mais susceptíveis a estas toxinas (DLUZEN, McDERMOTT & LIU, 1996; MISIAK, BEYER & ARNOLD, 2010; BARAKA et al., 2011; MATHEUS et al., 2012; MITRA et al., 2015; SCHAMNE et al., 2018).

O MPTP é uma pró-neurotoxina que é convertido em seu metabólito  $MPP^+$  pela ação da enzima monoamino oxidase-B (MAO-B) principalmente em astrócitos. O  $MPP^+$  entra nos neurônios dopaminérgicos por meio do transportador de dopamina (DAT). Dentro do neurônio, o  $MPP^+$  atua principalmente nas mitocôndrias, inibindo o complexo I mitocondrial, promovendo o aumento da produção de EROs, redução na produção de ATP, ativação de vias apoptóticas e respostas neuroinflamatórias, e, finalmente, a morte dos neurônios dopaminérgicos (SCHMIDT & FERGER, 2001; EBERHARDT & SCHULZ, 2003).

Estudos prévios têm demonstrado que animais geneticamente modificados apresentam diferente susceptibilidade ao MPTP. Camundongos knockout para o VMAT são mais susceptíveis a toxicidade do MPTP do que a linhagem selvagem (GAINETDINOV et al., 1998). Já camundongos knockout pro gene parkin não apresentaram aumento da susceptibilidade aos efeitos do MPTP em relação ao seu controle (linhagem selvagem) (AGUIAR et al., 2013). Por outro lado, camundongos knockout para o transportador de dopamina (DAT) são resistentes a intoxicação induzida pelo MPTP (BEZARD et al., 1999; GAINETDINOV et al., 1977). Demonstrando que alguns fatores genéticos podem influenciar nos efeitos de toxinas ambientais para o desenvolvimento da DP.

Por outro lado, o modelo da administração intranasal (i.n.) de MPTP desenvolvido em nosso laboratório é capaz de induzir comportamentos do tipo depressivo e anêdonicos, déficits cognitivos, olfatórios e motores em ratos e camundongos (PREDIGER et al. 2006, 2009, 2011; MOREIRA et al., 2010; CASTRO et al., 2012; AGUIAR et al., 2013). Na tentativa de avaliar a interação de fatores ambientais e genéticos em modelos animais da DP, Aguiar e colaboradores (2013) investigaram possíveis alterações na susceptibilidade de camundongos nocautes para Parkina frente à administração i.n. do MPTP. Entretanto,

os autores descreveram que estes animais apresentaram os mesmos níveis de neurodegeneração da via nigroestriatal em comparação aos camundongos selvagens tratados com MPTP i.n. No presente estudo, buscou-se dar continuidade na investigação da relevância de fatores genéticos na susceptibilidade aos efeitos da administração i.n. de MPTP, utilizando diferentes linhagens de ratos com perfis comportamentais contrastantes.

As linhagens isogênicas de ratos SHR e SLA16 possuem genoma idêntico com exceção da região genômica diferencial no cromossomo 4. Na linhagem SLA16 esta região é proveniente da linhagem Lewis. Esta região apresenta diversos genes, um deles é o *anxiety-related 16* responsável pela locomoção das linhagens na área central do campo aberto. Em comportamentos de caráter emocional estas linhagens apresentam diferenças quanto a exploração de áreas aversivas, e em algumas tarefas que envolvem aprendizado a linhagem SLA16 apresenta prejuízo quando comparada com a SHR (DE MEDEIROS et al., 2014; RAMOS et al., 1999).

Acredita-se que estas linhagens apresentam as mesmas alterações dopaminérgicas, exceto pela expressão da proteína  $\alpha$ -sinucleína cujo gene encontra-se na região genômica diferencial. Baseado nas alterações comportamentais e dopaminérgicas destas linhagens alguns trabalhos avaliaram a resposta destas a toxinas que induzem a DP em um modelo animal. Observou-se que as linhagens são resilientes a reserpina, contudo, no modelo da 6-OHDA apresentam comportamento tipo depressivo, anedônico e ansioso (FADANNI 2016, 2018; LEÃO et al., 2017; OLIVEIRA, 2018).

Diante do exposto acima, no presente estudo avançamos na caracterização de diferenças de respostas comportamentais em ratas das linhagens SHR e SLA16, bem como investigamos de maneira pioneira se a região cromossômica diferencial das linhagens SHR e SLA16 pode aumentar a susceptibilidade destas linhagens aos efeitos comportamentais e neuroquímicos induzidos pela administração de MPTP, em comparação a linhagem controle Wistar.





## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 UM BREVE HISTÓRICO SOBRE A DOENÇA DE PARKINSON

Em 1817, o neurologista inglês James Parkinson descreveu seis casos de pacientes que apresentavam um quadro clínico o qual ele chamou de “paralisia agitante”. Em seu trabalho intitulado “*An Essay on the Shaking Palsy*”, Parkinson descreveu os sintomas observados nos pacientes, como tremores involuntários com redução do tônus muscular, tanto em repouso quanto em movimento, e uma tendência a inclinar o tronco para frente e acelerar as passadas. Parkinson não observou comprometimento dos sentidos e da cognição dos seus pacientes (PARKINSON, 2002).

Anos após a publicação de James Parkinson, o neurologista francês Jean-Martin Charcot teve acesso ao documento e foi o responsável por descrever melhor o quadro de “paralisia agitante”, distinguindo-o de outras patologias neurológicas, principalmente a esclerose múltipla. Além disso, Charcot também caracterizou os sintomas cardinais da doença, como bradicinesia, tremor de repouso, rigidez, instabilidade postural e alterações no trato gastrointestinal. Foi Charcot quem sugeriu que a patologia descrita por James Parkinson fosse chamada de doença de Parkinson (GOETZ, 1986, 2011).

Por não observar prejuízo cognitivo nos pacientes, Parkinson acreditava que a porção superior da medula espinal estava relacionada à DP, mas não o encéfalo em si (PARKINSON, 2002). No entanto, cerca de um século após sua descrição pioneira, cientistas encontraram agregados proteicos eosinofílicos (corpos de Lewy) em diversas regiões encefálicas dos pacientes, e comprometimento dos neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta (SNpc). Também se observou que, ao contrário do que James Parkinson acreditava, esta neurodegeneração compromete também o intelecto dos pacientes (CARLSSON, LINDQVIST & MAGNUSSON, 1957; CARLSSON, 1959; LEES et al., 2008; ENGELHARDT & GOMES, 2017; PRZEDBORKI, 2017).

### 2.2 FISIOPATOLOGIA DA DP

A DP apresenta uma etiologia primária ainda desconhecida, um pequeno percentual dos casos (5-10%) tem caráter genético e a grande maioria tem caráter idiopático. Acredita-se que fatores ambientais sejam um dos grandes fatores de risco para o desenvolvimento da doença,

assim como sua interação com fatores genéticos (DAUER & PRZEDBORKI, 2003; POEWE et al., 2017).

A principal característica neuropatológica da DP é a degeneração dos neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc que fazem aferência com o estriado, comprometendo assim a via nigroestriatal e gerando um desbalanço na circuitaria associada ao tálamo e ao córtex motor, resultando nos déficits motores observados nos pacientes (POEWE et al., 2017; PRZEDBORKI, 2017). A SNpc também faz aferência com o bulbo olfatório, logo a morte neuronal na SNpc também afeta esta via (HÖGLINGER et al., 2015).

Outro marcador neuropatológico da DP são os agregados proteicos eosinofílicos de  $\alpha$ -sinucleína, os corpos de Lewy. Estes podem ser encontrados no citoplasma dos neurônios em diversas regiões encefálicas dos pacientes com a DP (SHULTS, 2006; POEWE et al., 2017). Braak e colaboradores (2003), observando os encéfalos *post-mortem* de pacientes com a DP correlacionaram a dispersão dos corpos de Lewy nos encéfalos desses pacientes com a progressão da doença. Com isso, conseguiram separar a DP em seis estágios. Nos estágios 1 e 2, os agregados proteicos são observados a nível de tronco encefálico e bulbo olfatório, nos estágios 3 e 4 a progressão dos corpos de Lewy aumenta atingindo regiões mesencefálicas, como a substância negra (SN). Por fim, nos últimos estágios (5 e 6), observa-se os corpos de Lewy em regiões neocorticais associadas também a um estágio bastante avançado da doença.

Hipotetiza-se que a  $\alpha$ -sinucleína, quando agregada, tenha propriedades prionicas, podendo ser transportada pelos axônios, secretada para a fenda sináptica e captada por outros neurônios, onde irá induzir a agregação proteica (POEWE et al., 2017).

Além dos corpos de Lewy, outras alterações bioquímicas responsáveis pela morte neuronal na DP são: disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, disfunção do retículo endoplasmático e do sistema ubiquitina-proteossoma, excitotoxicidade glutamatérgica e neuroinflamação (para revisão ver GOSWAMI, JOSHI & SINGH, 2017).

Estudos indicam a disfunção mitocondrial como principal elemento para a neurodegeneração observada na DP. Análises *post-mortem* observaram redução da atividade do complexo I mitocondrial na SNpc de pacientes com a DP (SCHAPIRA et al., 1989; GOSWAMI, JOSHI & SINGH, 2017). Esta redução pode ser causada pela exposição a toxinas ambientais e também pelo aumento da concentração de  $\alpha$ -sinucleína agregada. Esta proteína pode ser transportada para dentro das

mitocôndrias, em estado homeostático as mitocôndrias apresentam níveis baixos de  $\alpha$ -sinucleína, porém o aumento da concentração de agregados proteicos de  $\alpha$ -sinucleína no cérebro de pacientes com a DP leva a um aumento desta proteína nas mitocôndrias, que acabam por inibir o complexo I mitocondrial (DEVI et al., 2008; POEWE et al., 2017).

A mitocôndria é a organela responsável por gerar energia para as funções celulares fisiológicas, a redução na atividade do complexo I mitocondrial acarreta em redução da produção de ATP e por consequência prejuízos nas atividades celulares, aumentando os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) podendo levar à morte celular (GAKI & PAPAVALASSIOU, 2014; GOSWAMI, JOSHI & SINGH, 2017).

A redução dos níveis de ATP causada pela disfunção mitocondrial também afeta a atividade da proteína transportadora vesicular de monoaminas (VMAT), responsável pelo armazenamento vesicular de monoaminas, incluindo a DA. A redução da atividade desta proteína leva ao aumento da concentração de DA no citoplasma dos neurônios, onde esta é rapidamente oxidada formando EROs e contribuindo para o aumento do estresse oxidativo (ANDERSEN, 2004; GONZALEZ-HÉRNANDEZ et al., 2010).

Além da disfunção mitocondrial, a própria fisiologia dos neurônios dopaminérgicos da SN apresenta um nível basal elevado de estresse oxidativo. Estes neurônios apresentam atividade autônoma, com frequência baixa e sem necessidade de estímulo aferente (GONZALEZ-HÉRNANDEZ et al., 2010). Esta atividade é necessária para manter níveis constantes de DA nas diversas regiões que se conectam com a SN. Para manter esta atividade, os neurônios desta região apresentam canais de Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) do tipo L, diferente dos demais canais de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes nas demais regiões encefálicas, estes permanecem abertos por mais tempo aumentando a concentração do íon no meio intracelular (SURMEIER et al., 2011). A abertura prolongada desses canais de  $\text{Ca}^{2+}$  gera um estado oxidativo basal elevado na célula, prejudicando a atividade mitocondrial e do retículo endoplasmático (GONZALEZ-HÉRNANDEZ et al., 2010; SURMEIER et al., 2011).

Para manter os níveis homeostáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  é necessário gasto de ATP, contudo, devido a disfunção mitocondrial no cérebro dos pacientes com a DP, os níveis de ATP estão reduzidos, logo há um desbalanço na entrada do íon na célula, aumento o estresse oxidativo (que *per se* já era elevado) e redução das enzimas responsáveis pela eliminação das EROs. Além disso, o aumento de EROs leva a alterações

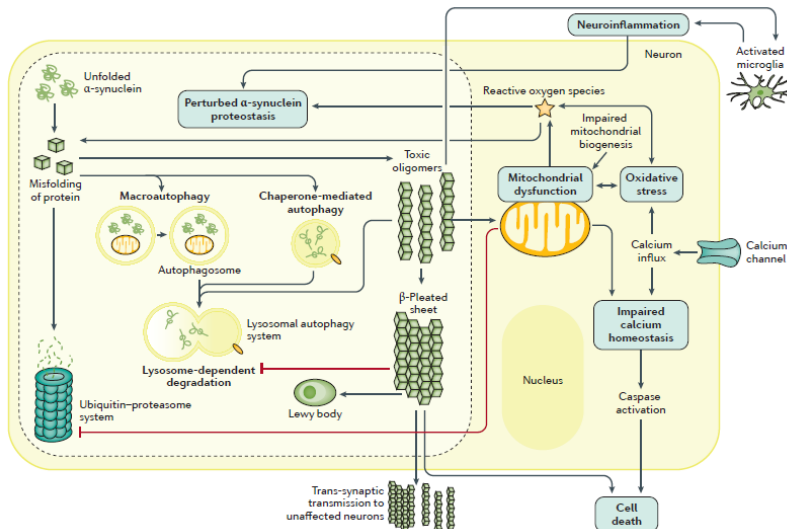
de proteínas, lipídios e mutações no DNA (ANERSEN, 2004; BARNHAM, MASTERS & BUSH, 2004; GOSWAMI, JOSHI & SINGH, 2017; POEWE et al., 2017).

O sistema ubiquitina-proteossoma é o responsável por marcar as proteínas com alguma alteração ou má-conformação estrutural para então degradá-las. A inibição da atividade do complexo I mitocondrial prejudica a atividade do proteossoma, impedindo a degradação de proteínas danificadas. A redução da enzima antioxidante glutathione peroxidase (GPx) inibe a atividade das proteínas de ubiquitinação, resultando no aumento de proteínas oxidadas na célula e inibição da atividade do proteossoma (ANDERSEN, 2004; DIAS, JUNN & MOURADIAN, 2013).

As alterações neuronais apresentadas durante o desenvolvimento da patogênese da DP acabam por sinalizar e ativar as células gliais, os astrócitos e a micróglia. Estes funcionam como células do sistema imune inato no cérebro. Estas células liberam citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-beta (IL- $\beta$ ), na tentativa de proteger os neurônios. Contudo, quando ativada de maneira crônica, a neuroinflamação que levaria a uma neuroproteção pode ativar mecanismos de morte celular, ocasionando em neurodegeneração (ANDERSEN, 2004; DIAS, JUNN & MOURADIAN, 2013; NIRANJAN, 2014; POEWE et al., 2017).

Além da morte neuronal causada pela liberação das citocinas pró-inflamatórias pela microglia (ou via extrínseca), a via de apoptose intrínseca também pode ser ativada na patogênese da DP (GOSWAMI, JOSHI & SINGH, 2017). O estresse oxidativo pode gerar tantos prejuízos dentro da célula (citados acima), que a mesma, para evitar mais danos libera moléculas pró-apoptóticas para a mitocôndria que libera o citocromo c ativando assim a via das caspases, levando à morte celular (ANDERSEN, 2004; GOSWAMI, JOSHI & SINGH, 2017; VILA & PRZEDBORSKI, 2003). A figura 1 apresenta um sumário das alterações celulares descritas neste tópico.

Figura 1- Ilustração das alterações celulares observadas na DP.



Fonte: POEWE et al., 2017.

### 2.3 SINTOMAS NÃO MOTORES DA DP

A DP é caracterizada pelos sintomas motores apresentados pelos pacientes, como tremor de repouso, bradicinesia e rigidez (SCHAPIRA, CHAUDHURI & JENNER, 2017). Estes são os sintomas considerados cardinais para o seu diagnóstico. Além destes, os pacientes podem apresentar, conforme a progressão da doença, dificuldade para falar e deglutir, instabilidade postural e marcha arrastada (PARKINSON, 2002).

Os sintomas motores são decorrentes da neurodegeneração dopaminérgica da via nigroestriatal, entretanto somente se tornam aparentes quando cerca de 70% dos neurônios que compõem esta via já se degeneraram (POSTUMA & BERG, 2016). Atualmente já se sabe que os sintomas motores podem aparecer por volta de 10-20 anos após o início dos danos celulares característicos da DP. Neste período, alguns sintomas não motores podem ser observados e podem piorar com o avanço da doença. Outros sintomas não motores, como a demência, surgem em estágios mais avançados da DP, após inclusive dos sintomas motores (CHAUDHURI, HEALY & SCHAPIRA, 2006; POSTUMA & BERG, 2016; SCHAPIRA, CHAUDHURI & JENNER, 2017).

Acredita-se que os sintomas não motores possam surgir devido ao comprometimento de outros sistemas de neurotransmissão além do dopaminérgico e que também possam surgir ou se agravarem conforme a progressão dos corpos de Lewy no encéfalo do paciente (CHAUDHURI, HEALY & SCHAPIRA, 2006; SCHAPIRA, CHAUDHURI & JENNER, 2017).

A hiposmia, prejuízo na percepção de odores, é um dos sintomas não motores mais comuns nos pacientes com DP. Este sintoma é acompanhado pela presença de corpos de Lewy no bulbo olfatório nos estágios iniciais da DP (BABA et al., 2011; SCHAPIRA et al., 2017).

Dentre os sintomas não motores, disfunções urinárias e gastrointestinais, e alterações cardiovasculares, estão entre os sintomas autonômicos que podem surgir no período pré-motor. Estes tendem a ficar mais frequentes e graves com o avanço da patologia. Assim como a hiposmia, esses sintomas estão relacionados com a presença dos agregados proteicos no tronco encefálico e alterações nas transmissões noradrenérgica e colinérgica (BRAAK et al., 2003; POSTUMA & BERG, 2016; SCHAPIRA et al., 2017).

Os pacientes com a DP podem também apresentar quadros de dor (neuropática ou nociceptiva), e de distúrbios visuais, como diplopia, visão borrada até alucinações visuais. A última está relacionada com quadros mais severos da DP e fortemente associado ao aparecimento dos sintomas de demência, a presença dos corpos de Lewy no córtex pré-frontal e o comprometimento de outras estruturas encefálicas além da SNpc (BOSBOOM, STOFFERS & WOLTERS, 2004; AARSLAND et al., 2017; SCHAPIRA, CHAUDHURI & JENNER, 2017).

Alterações no sono REM, sonolência diurna excessiva e cochilos involuntários são alguns sintomas também observados em pacientes em fases iniciais da DP. Estas alterações surgem devido à neurodegeneração dos núcleos controladores do sono no tronco encefálico e em vias talamocorticais (CHAUDHURI, HEALY & SCHAPIRA, 2006; POSTUMA & BERG 2016).

Sintomas de alteração de humor, como depressão, ansiedade, apatia e fadiga, são comuns na fase pré-motoras, mas também podem se desenvolver com o diagnóstico da doença e a piora dos sintomas motores. Alterações serotoninérgicas e dopaminérgicas em regiões mesolímbicas tem papel fundamental no aparecimento desses sintomas (POSTUMA & BERG, 2016; SCHAPIRA, CHUDHURI & JENNER, 2017; THOBOIS et al., 2017).

Na maioria dos casos, os pacientes com DP apresentam os sintomas de depressão e ansiedade associados, porém se observou que

alguns pacientes apresentam apenas depressão e outros apenas ansiedade, além dos outros sintomas não motores (BROWN et al., 2011; ZHU, VAN HILTEN & MARINUS, 2017). Pacientes que apresentam ansiedade sem depressão exibem sintomas que se enquadram no transtorno de ansiedade generalizada. Por outro lado, enquanto pacientes que apresentam depressão isoladamente ou depressão e ansiedade, exibem sintomas de anedonia, tristeza, baixa autoestima, dificuldade de concentração, pensamento lento, entre outros. Contudo, pacientes que apresentam depressão e ansiedade, além dos sintomas depressivos acima citados, também apresentam irritabilidade, pânico e tensão (BROWN et al., 2011).

A presença de transtornos de humor podem também representar fator de risco para o desenvolvimento da DP. Estudos mostram que o risco de desenvolver a DP é maior em pessoas que tiveram algum transtorno de humor durante a vida adulta (DALLÉ & MABANDLA, 2018; ZHU, VAN HILTEN & MARINUS, 2017).

A incidência da DP é maior em homens do que em mulheres, numa razão de 2:1, aproximadamente. Contudo, as mulheres com DP apresentam mais sintomas não motores do que os homens (SAUNDERS-PULLMAN, 2003; JURADO-CORONEL et al., 2017; POEWE et al., 2017). Sintoma de depressão, ansiedade, anedonia, falta de motivação, constipação, dor e problemas cardíacos são mais frequentes em mulheres do que em homens (PICILLO et al., 2013; JURADO-CORONEL et al., 2017).

Os sintomas da DP também se manifestam de maneiras diferentes entre homens e mulheres. As mulheres demoram mais para apresentar os sintomas motores clássicos, e as mesmas apresentam mais tremor do que os homens. Além disso, o tratamento com L-DOPA induz mais discinesias em mulheres do que em homens (PICILLO et al., 2017; SAUNDERS-PULLMAN, 2003). Apesar desta influência do gênero na DP, a grande maioria dos estudos realizados em modelos animais tem utilizado ratos e camundongos machos.

As pesquisas clínicas têm avançado no sentido de encontrar biomarcadores e sinais clínicos da fase pré-motora que permitam um diagnóstico mais precoce da DP. Além disso, a neurobiologia dos sintomas não motores da DP precisa ser melhor compreendida para que se alcance tratamento eficaz, uma vez que estes sintomas, principalmente ansiedade, depressão e demência, prejudicam o prognóstico e a qualidade de vida do paciente (MARTINEZ-MARTIN, 2014; POSTUMA & BERGER, 2016).

## 2.4 MODELOS ANIMAIS DA DP

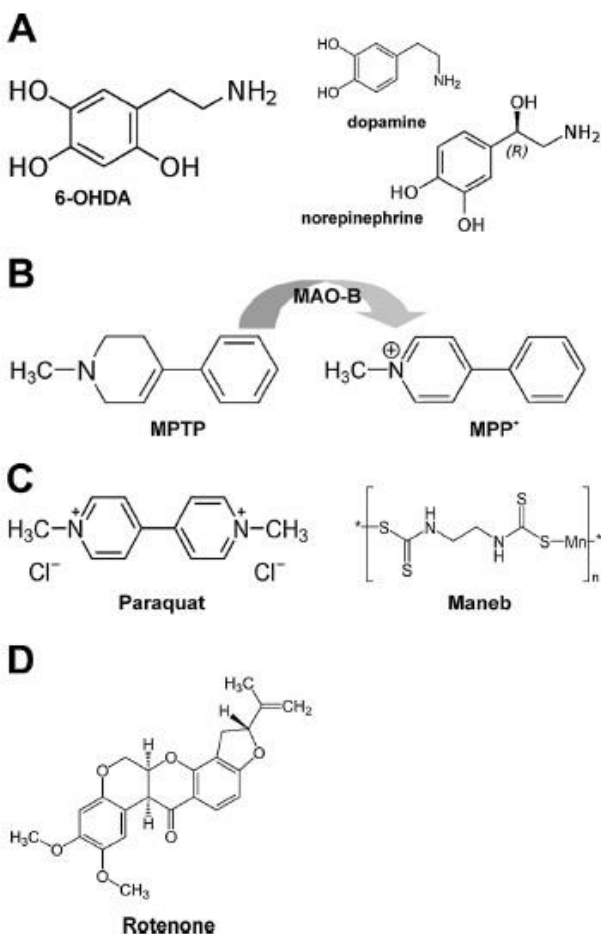
A DP é caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos nos núcleos da base e na SNpc, além do aumento do estresse oxidativo decorrente da disfunção do complexo I mitocondrial (JIANG & DICKSON, 2017; DAWSON, GOLDE & LAGIER-TOURENNE, 2018; GHATAK et al., 2018). Devido à etiologia multifatorial da DP, que pode ter caráter idiopático (ambiental), genético ou a interação entre estes fatores, os modelos animais da DP buscam reproduzir as alterações dopaminérgicas e demais alterações celulares observadas nos pacientes com DP, utilizando ferramentas genéticas (animais transgênicos) e farmacológicas (toxinas) (DAWSON, GOLDE & LAGIER-TOURENNE, 2018).

Diversos genes estudados demonstraram ter algum polimorfismo relacionado à DP, mas poucos destes estão sendo estudados em modelos animais transgênicos. Por exemplo, os camundongos nocautes para o gene SNCA que codifica a  $\alpha$ -sinucleína, para o gene PINK1 que está envolvido na respiração celular, enovelamento e degradação de proteínas, e para o gene DJ-1 que tem papel na manutenção do complexo I mitocondrial (GHATAK et al., 2018)

Dentre as principais toxinas utilizadas como modelos da DP, estão a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), a rotenona e o paraquat. Uma característica comum de todas essas toxinas é o seu mecanismo de ação, todas atuam inibindo o complexo I mitocondrial levando a um aumento do estresse oxidativo e por consequência à morte de neurônios dopaminérgicos (Figura 2) (GUBELLINI & KACHIDIAN, 2015; GHATAK et al., 2018).



Figura 2 - Ilustração dos principais agentes farmacológicos utilizados para a indução de modelos animais da DP.



Fonte: GUBELLINI & KACHIDIAN, 2015.

Alguns trabalhos já demonstraram diferença de gênero na susceptibilidade às toxinas e também a influências dos hormônios esteroides. Em modelo de cultura de neurônios mesencefálicos expostos à 6-OHDA, observou-se que os neurônios de camundongos machos apresentaram maior susceptibilidade a toxina e um maior aumento do

estresse oxidativo quando comparados aos neurônios de camundongos fêmeas (MISIAK, BEYER & ARNOLD, 2010).

No modelo da 6-OHDA se observou que fêmeas ovariectomizadas e expostas a toxina apresentam alterações comportamentais, depleção de DA e seus metabólitos no estriado (BARAKA et al., 2011). Na ausência de estrogênios, fêmeas lesionadas com 6-OHDA apresentam maior perda de células dopaminérgicas e maior ativação astrocitária na SNpc (SIANI et al., 2017).

Mitra e colaboradores (2015) observaram que camundongos *Swiss* albinos machos e fêmeas quando expostos a um tratamento crônico com rotenona apresentam aumento da atividade das enzimas responsáveis pela degradação das EROs e perda de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos. No entanto os camundongos machos não apresentam alteração no número de astrócitos na SNpc e ainda demonstraram redução no percentual de células microgliais na região em comparação com as fêmeas.

No modelo do MPTP diversos trabalhos já demonstraram diferenças entre os gêneros na susceptibilidade a toxina em diferentes protocolos de administração. Contudo, os resultados não são conclusivos, uma vez que em alguns trabalhos as fêmeas se mostram resistentes em comparação aos machos, e em outros as mesmas são mais susceptíveis aos efeitos da toxina (DLUZEN, MCDERMOTT & LIU, 1996; MILLER et al. 1998; JONIEC et al., 2009; OOKUBO et al., 2009; ANTZOULATOS et al., 2011; MATHEUS et al., 2012; YADAV, PANDEY & SINGH, 2017; SCHAMNE et al., 2018).

Alguns desses trabalhos estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Sumário de trabalhos de comparação da influência do gênero e/ou estrogênio na susceptibilidade ao MPTP.

Modelo	Resultados	Referências
Camundongos C57BL/6 machos e fêmeas gonadectomizados – 4 injeções i.p. de 10 mg/kg de MPTP em intervalos de 2 h	A administração de MPTP (i.p.) induziu maior depleção de dopamina nos camundongos machos do que nas fêmeas. Machos gonadectomizados e tratados com estradiol apresentaram menor redução de dopamina em relação ao não tratado.	(DLUZEN, McDERMOTT & LIU, 1996)

	As fêmeas ovariectomizadas tiveram maior depleção de dopamina em comparação com as fêmeas tratadas com estradiol.	
Camundongos C57BL/6 machos e fêmeas – 4 injeções i.p. de 20 mg/kg de MPTP em intervalos de 2 h	Observou-se redução mais pronunciada de DAT, dopamina e seus metabólitos no estriado de fêmeas do que em machos. As fêmeas também apresentaram maior redução de TH no estriado e no mesencéfalo em relação aos machos. Elas também apresentaram maior nível de GFAP estriatal após administração da toxina.	(OOKUBO et al., 2009)
Camundongos C57BL/6 machos e fêmeas (2 e 12 meses) – 4 injeções de 15 mg/kg (jovens) e 10 mg/kg (adultos) de MPTP em intervalos de 1 h	Camundongos machos jovens e adultos apresentaram redução significativa dos níveis de dopamina, enquanto que o mesmo não foi observado em fêmeas. A recuperação de dopamina foi melhor em camundongos jovens fêmeas do que em machos da mesma idade.	(JONIEC et al., 2009)
Camundongos swiss albino fêmeas ovariectomizadas – 2 injeções i.p. de 15 mg/kg de MPTP em intervalo de 16 h	Os animais ovariectomizados que receberam MPTP apresentaram prejuízo nas tarefas de parâmetro locomotor ( <i>hanging test</i> e <i>narrow beam walking</i> )	(YADAV, PANDEY & SINGH, 2017)

	<i>test</i> ). Este grupo também apresentou uma redução no % de alternâncias corretas no labirinto em Y. No grupo MPTP foi observado que a atividade da enzima catalase e os níveis de nitrito estavam aumentados na região nigroestrital.	
Camundongos C57BL/6 fêmeas com 15 meses de idade – administração i.n. de 1 mg/narina de MPTP	A administração i.n. de MPTP induziu prejuízos na memória social de curto prazo, gerou déficits locomotores (teste de escore neurológico), e redução no número de quadrados cruzados e <i>rearings</i> no teste do campo aberto. Observou-se também redução de 50% de neurônios TH <sup>+</sup> na SNpc e redução da receptação de glutamato no hipocampo.	(MATHEUS et al., 2012)
Camundongos C57BL/6 machos, fêmeas jovens, ovariectomizadas e envelhecidas – administração i.n. de 1 mg/narina de MPTP	Todos os grupos com fêmeas que receberam MPTP apresentaram comportamento tipo-anedônico e tipo-depressivo Também se observou nesses grupos redução nos níveis de BDNF e GDNF no hipocampo e no córtex pré-frontal, e redução de TH no estriado. Nenhuma dessas alterações foi observada	(SCHAMNE et al., 2018)

	nos camundongos machos que passaram pela administração i.n. de MPTP.	
--	--	--

Fonte: A autora (2018)

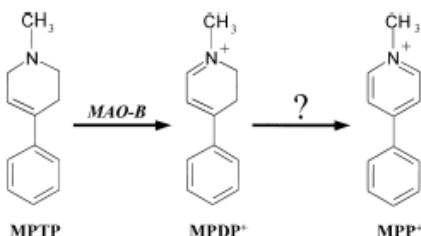
Além das toxinas mencionadas anteriormente, alguns grupos também utilizam a reserpina como um modelo da DP ( SANTOS et al., 2013; LEÃO et al., 2015). A reserpina é um inibidor do transportador vesicular de monoaminas (VMAT-2), impedindo o armazenamento vesicular e levando a depleção de monoaminas (LEÃO et al., 2015).

### 2.4.1 O modelo do MPTP

O potencial parkinsoniano do MPTP foi descoberto acidentalmente quando um grupo de usuários de heroína apresentaram sintomas parkinsonianos após o uso de um lote contaminado. Posteriormente foi descoberto que a substância contaminante responsável pelas alterações observadas era o MPTP. Hoje, esta toxina é um modelo clássico para indução de sintomas tipo-parkinsonianos em modelos animais (SCHMIDT & FERGER, 2001).

O MPTP é uma pro-neurotoxina lipofílica capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Ao atravessá-la, o MPTP é captado pelos astrócitos onde é convertido em MPDP<sup>+</sup> pela enzima monoamina oxidase B (MAO-B), e esta é oxidada na toxina MPP<sup>+</sup> (Figura 3). Os astrócitos liberam o MPP<sup>+</sup> no espaço extracelular e este é captado pelo transportador de dopamina (DAT) que colocam o MPP<sup>+</sup> para dentro dos neurônios dopaminérgicos (SCHMIDT & FERGER, 2001; EBERHARDT & SCHULZ, 2003;).

Figura 3 - Biotransformação da pró-neurotoxina MPTP em MPP<sup>+</sup>



Fonte: SCHMIDT & FERGER, 2001.

Dentro dos neurônios, o  $MPP^+$  é captado pela mitocôndria onde inibe o complexo I mitocondrial, reduzindo a produção de ATP e aumentando a produção de EROs, levando às alterações mencionadas no item 2.2. O  $MPP^+$  também é transportado para dentro de vesículas pela VMAT. Dentro das vesículas a toxina não causa danos diretos à célula, no entanto expulsa a DA presente nas vesículas para o citosol. E como mencionado no item 2.2, a DA no citosol pode ser oxidada liberando mais EROs e aumentando o estresse oxidativo (SMEYNE & JACKSON-LEWIS, 2005; MORE et al., 2016).

Além dos efeitos do  $MPP^+$  nos neurônios dopaminérgicos, essa toxina aumenta a expressão de  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$  nos astrócitos, iniciando um processo de neuroinflamação podendo ativar vias apoptóticas, e consequentemente, morte neuronal (SMEYNE & JACKSON-LEWIS, 2005).

Grande parte dos trabalhos em modelos animais envolvendo MPTP faz a sua administração pela via intraperitoneal (i.p), no entanto são utilizadas múltiplas administrações para observar efeito significativo da toxina, ao final do protocolo se utiliza uma quantidade grande de toxina. Rojo e colaboradores (2006), propuseram um modelo de administração intranasal (i.n.) crônica de MPTP em camundongos, levando a alterações na atividade locomotora desses animais. No entanto, essas alterações refletiam em estágios avançados da DP. Nosso grupo foi pioneiro na padronização da administração do MPTP pela via intranasal, com uma única administração por narina (aguda) e menor quantidade da toxina. Com este protocolo foi possível observar déficits olfatórios, cognitivos, emocionais, locomotores e neuroquímicos, tanto em ratos quanto em camundongos, similares aos observados em estágios pré-motores da DP (PREDIGER et al., 2006, 2009; MOREIRA et al., 2010; CASTRO et al., 2012; MATHEUS et al., 2012; AGUIAR et al., 2013; TRISTÃO et al., 2014; SCHAMNE et al., 2018).

A administração i.n. de MPTP se baseia na hipótese da vetorização olfatória proposta por Doty (2008). O autor observou que pacientes com a DP apresentam prejuízo olfatório nos primeiros anos das patologias. Acredita-se então, devido à anatomia do sistema olfatório que este seja uma porta de entrada para diversas toxinas ambientais (metais, vírus, agrotóxicos entre outros) que levam ao desenvolvimento da DP (DOTY, 2008).

A cavidade nasal é muito propícia para a entrada de agentes externos, e contribuindo com isso o nervo olfatório é bastante vulnerável a estes agentes. Os dendritos e projeções das células receptoras

olfatórias que compõem este nervo formam uma área de superfície de aproximadamente 23 cm<sup>2</sup> que cobre a cavidade nasal e formam um neuroepitélio. Além disso, estas células são neurônios de primeira ordem, ou seja, possuem projeções diretas para o encéfalo sem interferência de nenhuma sinapse (DOTY, 2008).

Quando administrado pela via i.n., o MPTP atravessa o neuroepitélio da cavidade nasal, é convertido em MPP<sup>+</sup> e captado pelos neurônios dopaminérgicos do bulbo olfatório (BO), e por comunicação retrograda chega aos neurônios dopaminérgicos da SNpc, levando a alterações nas demais vias que se comunicam com esta estrutura. Refletindo assim, em alterações comportamentais e bioquímicas observadas nos modelos animais (PREDIGER et al. 2011; HÖGLINGER et al. 2015).

Como descrito anteriormente, em um estudo prévio desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, Aguiar et al. (2013) investigaram a influência da interação de fatores genéticos (uso de camundongos nocautes para Parkina) e ambientais (administração i.n. de MPTP) no desenvolvimento de sintomas motores e degeneração dopaminérgica. Apesar da ausência de interações significativas entre os fatores genéticos e ambientais estudados no desenvolvimento dos sintomas motores e lesão dopaminérgica, permanece inexplorado se existiria uma interação entre estes fatores no desenvolvimento dos sintomas não motores (como prejuízos de memória, depressão e ansiedade) da DP.

## 2.5 AS LINHAGENS SHR E SLA16

As linhagens isogênicas de ratos Lewis (LEW) e espontaneamente hipertensos (SHR do inglês *spontaneously hypertensive rats*) apresentam comportamentos contrastantes em relação a parâmetros de ansiedade. Sendo a linhagem SHR com menor comportamento tipo-ansioso em relação a linhagem LEW e que tende a explorar mais as áreas aversivas do campo aberto (área central) e do labirinto em cruz elevado (braços abertos) (RAMOS et al., 1998). No teste da caixa claro/escuro a linhagem LEW apresenta uma menor locomoção e um percentual de tempo reduzido na área iluminada do aparato em comparação com a linhagem SHR. Em contrapartida, no compartimento escuro a locomoção dos animais LEW é maior do que a dos SHR. Em relação ao teste do nado forçado, a linhagem LEW apresenta um tempo de imobilidade maior do que os SHR (HINOJOSA et al., 2006).

Quanto às alterações bioquímicas entre as linhagens, a linhagem LEW apresenta níveis elevados da proteína  $\alpha$ -sinucleína no hipocampo e um *turnover* de DA reduzido na mesma região, em comparação com a linhagem SHR (CHIAVEGATTO et al., 2009).

Um estudo de QTL (loci de característica quantitativa) utilizando as duas linhagens mostrou uma região genômica no cromossomo 4 de ratos que estava relacionada com características emocionais. Esta região foi chamada primeiramente de *Ofill* (*Open field inner locomotion*) e tem influência sobre a locomoção dos animais na área central no teste do campo aberto. Atualmente esta região é nomeada como *Anxrr16* (Resposta relacionada à ansiedade 16, do inglês *anxiety related response 16*) (RAMOS et al, 1999).

A partir destes resultados, iniciaram-se diversos trabalhos para compreender a influência desta região genômica nos comportamentos relacionados à emocionalidade. O objetivo foi criar uma linhagem com o genoma idêntico ao SHR (linhagem receptora) com exceção de uma porção do cromossomo 4 que conteria a QTL proveniente dos animais LEW (linhagem doadora). Foi criada assim a linhagem SHR.LEW.*Anxrr16* (SLA16) (PEREIRA, 2010; DE MEDEIROS et al., 2013,2014).

A hipótese era de que a linhagem SLA16 teria uma maior locomoção na área central do campo aberto do que a linhagem parental (SHR). E o resultado obtido foi que os animais SLA16 apresentam este perfil, independente de ciclo estral e luminosidade do ambiente. Os comportamentos observados na linhagem SLA16 comprovam os efeitos contraintuitivo e transgressivo do QTL, mostrando que os animais apresentam níveis de comportamento tipo-ansioso ainda menores do que a linhagem SHR (DE MEDEIROS et al., 2013, 2014).

A partir da construção da linhagem congênica, abriram-se portas para a realização de diversos estudos com estes animais. Observaram-se diferenças entre os gêneros em ambas as linhagens, onde as fêmeas tendem a se locomover mais do que os machos. Um menor perfil tipo-ansioso da linhagem SLA16 em comparação a linhagem SHR. Prejuízo na tarefa de realocação de objeto em comparação a linhagem SHR. Um maior consumo de etanol da linhagem SHR em relação a SLA16. E maior perfil tipo-impulsivo observado na linhagem SLA16 no labirinto em T (PEREIRA, 2010; DE MEDEIROS et al., 2013; CORVINO, 2015; ANSELMi et al., 2016; GRANZOTTO, 2016; CHÁVEZ, 2017; DOS ANJOS, 2017). Um sumário com os resultados obtidos com os estudos dessa linhagem em comparação com os SHR pode ser observado no Quadro 2.



Quadro 1 - Sumário de resultados de trabalhos de comparação entre as linhagens SLA16 e SHR.

Teste	Gênero	Resultado	Referências
Caixa claro/escuro	Machos	Ratos SLA16 passam mais tempo no compartimento claro e fazem mais transições entre os compartimentos em relação aos SHR.	(DE MEDEIROS et al., 2013; DOS ANJOS, 2017)
	Fêmeas	As SLA16 passam mais tempo no compartimento claro do que os machos SLA16 e do que as fêmeas SHR.	
Caixa de atividade		Ao final de um protocolo de 5 dias de 1 hora de exposição ao aparato, machos SHR apresentam uma maior locomoção e nenhuma linhagem habitua ao aparato. Em um protocolo de 24 horas de exposição a linhagem SLA16 teve maior locomoção do tempo 0-10 minutos e 50-60 minutos, ao final das 23 horas de exposição as linhagens apresentam os mesmos escores de locomoção independente do sexo.	(DE MEDEIROS et al., 2013; GRANZOTTO, 2016)
Campo aberto	Machos	A linhagem SLA16 percorre maiores distâncias total, no centro e na periferia, além de permanecer mais tempo na área central do aparato.	(DE MEDEIROS et al., 2013; CORVINO, 2015; ANSELMINI et al., 2016;

		Quando expostos ao aparato durante 5 minutos por 5 dias nenhuma linhagem habitou ao mesmo, porém quando expostas um único dia por 15 minutos, avaliados em blocos de cinco minutos, os animais habituam ao aparato.	GRANZOTT O, 2016; CHÁVEZ, 2017; DOS ANJOS, 2017)
	Fêmeas	As fêmeas SLA16 apresentam uma maior locomoção total, no centro e na periferia, e maior tempo no centro em comparação com as SHR. A distância percorrida em todos os parâmetros e o tempo no centro é maior nas fêmeas SLA16 do que nos machos.	
Consumo de etanol	Fêmeas	As fêmeas SHR apresentam maior consumo de etanol em relação às fêmeas SLA16.	(DOS ANJOS, 2017)
Labirinto aquático – memória de procedimento	Machos	Não há diferenças entre as linhagens para esta tarefa.	(GRANZOTTO, 2016)
Labirinto aquático – memória de trabalho	Machos	Não há diferenças entre as linhagens para esta tarefa, independente da idade.	(CHÁVEZ, 2017)
Labirinto em cruz elevado	Machos	A linhagem SLA16 apresenta um número maior de entradas no braço aberto assim como	(CORVINO, 2015; DOS ANJOS, 2017)

		maior % de tempo no mesmo em comparação com a linhagem SHR.	
	Fêmeas	A linhagem SLA16 explora mais os braços aversivos do que as SHR.	
Labirinto em T	Machos	A linhagem SLA16 apresenta menor latência para a esquiva (saindo mais rápido do braço fechado) em comparação a linhagem SHR.	(DE MEDEIROS et al., 2013)
Labirinto em Y	Machos	Ambas as linhagens, independente da idade, reconheceram o braço novo do labirinto na memória de curta duração.	(CHÁVEZ, 2017)
Medo Condicionado	Machos	Ratos SLA16 apresentam um número maior de tentativas de escape em relação ao SHR.	(ANSELMÍ et al., 2016)
	Fêmeas	Apenas a linhagem SHR aumentou o tempo de congelamento na sessão de teste em relação ao pré-condicionamento.	
Nado Forçado	Machos	Não há diferenças entre as linhagens no tempo de imobilidade, escalada e nado.	(FADANNI, 2018)
Realocação de objeto	Machos	Aos dois meses nenhuma linhagem reconhece o objeto realocado na memória	(CHÁVEZ, 2017)

		de curta duração, após 24 horas a linhagem SLA16 continua com o prejuízo e a linhagem SHR reconhece o objeto. Aos 10 meses a linhagem SHR não apresenta prejuízo na memória de curta e de longa duração, já a linhagem SLA16 apresenta prejuízo nos dois parâmetros.	
Reconhecimento de objeto	Ambos	As duas linhagens reconhecem o objeto novo	(ANSELMINI et al., 2016)

Fonte: A autora (2018).

Além de ser um modelo animal genético para o estudo de respostas de emocionalidade, a linhagem SHR também é um modelo para o estudo do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (SAGVOLDEN, 2000). Estudos demonstraram diferenças de comportamento entre machos e fêmeas de SHR, sendo que no CA as fêmeas apresentam maior locomoção do que os machos, e estes apresentam pressão sanguínea mais elevada do que as fêmeas. Além disso, discute-se que a hiperatividade da linhagem pode ter mecanismos diferentes entre os sexos, uma vez que se observa que os machos apresentam mais o perfil hiperativo e impulsivo enquanto as fêmeas o perfil inatento com alguns prejuízos cognitivos (RAMOS et al., 1998; BERGER & SAGVOLDEN, 1998).

Acredita-se que, por possuir a maior parte de seu genoma proveniente da linhagem SHR, os animais SLA16 apresentem as mesmas alterações bioquímicas que a linhagem parental, como: expressão aumentada do transportador de DA (DAT) e do receptor dopaminérgico D1e D2 no estriado, prejuízo do armazenamento de DA em vesículas, levando a uma hipofunção dopaminérgica a nível de córtex pré-frontal, estriado e nucleus accumbens, além de redução na metabolização de DA em diversas regiões encefálicas ( WATANABE et al., 1997; RUSSELL et al., 1998; RUSSELL, 2002). Em um estudo recente foi observado que as linhagens SHR e SLA16 apresentam os

mesmo níveis de alfa-sinucleína e DA no hipocampo, córtex pré-frontal e estriado (OLIVEIRA, 2018).

Estudos recentes utilizaram as linhagens SHR e SLA16 em um modelo de DP induzido pela administração crônica de reserpina e a injeção bilateral de 6-OHDA no estriado. No modelo de administração crônica em baixas doses (0,1 mg/kg) de reserpina, machos da linhagem SHR se mostraram mais resistentes aos efeitos da reserpina quando comparados a linhagem Wistar (LEÃO et al., 2017). O mesmo protocolo utilizado nas linhagens SHR, SLA16 e LEW, mostrou que todas as linhagens apresentaram prejuízos motores (FADANNI, 2016).

Já a injeção bilateral de 6-OHDA no estriado em machos das linhagens SHR e SLA16, induziu comportamentos do tipo depressivo no teste da borrifada de sacarose e no teste do nado forçado, e comportamentos do tipo-ansioso no teste do labirinto em cruz elevado. Contudo não houve diferença entre as linhagens na susceptibilidade a toxina observada nos testes comportamentais nem nos testes bioquímicos, onde ambas as linhagens que receberam a toxina apresentaram redução no *turnover* de DA (FADANNI, 2018).

### **3 JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista o envelhecimento da população mundial e o aumento do risco de desenvolver doenças neurodegenerativas, se faz necessário avançar os estudos em modelos animais destas doenças. O avanço no conhecimento acerca dos sintomas não motores da DP (como a depressão, ansiedade e prejuízos cognitivo) é de grande relevância, uma vez que representam sintomas precoces da DP, além de comprometerem significativamente o prognóstico da doença e a qualidade de vida dos pacientes (LANG & OBESO, 2004; MARTINEZ-MARTIN, 2014). Apesar da etiologia multifatorial da DP e as diferentes manifestações clínicas entre homens e mulheres, existem poucos estudos experimentais utilizando roedores fêmeas para investigar a interação entre fatores ambientais e genéticos.

## 4 HIPÓTESE

- Com base nas diferenças da região genômica diferencial das linhagens SHR e SLA16, hipotetizamos que essas variações tornem estas linhagens mais susceptíveis aos efeitos do MPTP em comparação as ratas da linhagem Wistar;
- Considerando as respostas comportamentais relacionadas a emocionalidade, como o menor perfil tipo-ansioso, hipotetiza-se que as linhagens SHR e SLA16 são mais susceptíveis aos efeitos da administração i.n. de MPTP em comparação as fêmeas da linhagem Wistar.

## 5 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a memória, respostas comportamentais relacionadas à emocionalidade e marcadores da neurotransmissão dopaminérgica em ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16.

### 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a memória espacial de curto prazo e a memória de procedimento de ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 utilizando os testes do reconhecimento de objetos e labirinto aquático;
- Investigar os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre comportamentos relacionados à depressão, anedonia e ansiedade em ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 utilizando o teste do nado forçado, borrifada de sacarose, campo aberto e labirinto em cruz elevado;
- Investigar os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre o imunotéudo da enzima tirosina hidroxilase (TH) e do transportador de dopamina (DAT) no estriado de ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16.



## 6 MATERIAL E MÉTODOS

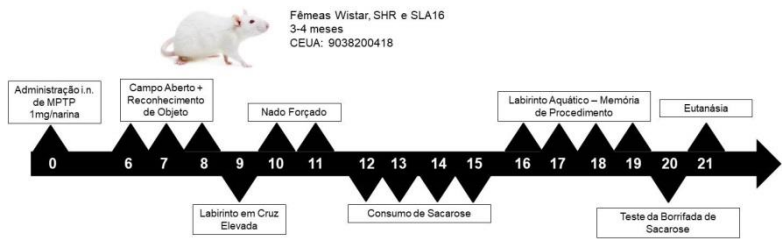
### 6.1 ANIMAIS

Para a realização do presente trabalho foram utilizadas 72 ratas (24 animais/linhagem) das linhagens Wistar, SHR e SLA16 com idade entre 90 e 120 dias pós-natal. A linhagem Wistar foi oriunda do Biotério Central, enquanto as linhagens SHR e SLA16 foram oriundas do biotério do Laboratório de Genética do Comportamento. Os animais foram acomodados em até 5 animais por caixa moradia (50x30x15 cm), com água e ração *ad libitum*, ciclo claro-escuro (luzes acesas das 7 h as 19 h) e temperatura controlada  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Este trabalho foi realizado de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e aprovado segundo o protocolo nº 9038200418.

### 6.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Baseado em trabalhos anteriores do nosso laboratório, o protocolo experimental utilizado no presente estudo consistiu em 21 dias, sendo a administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) realizada no dia 0. No período do 6º ao 8º dia foi realizada a habituação ao campo aberto e o teste de RO. No 9º dia foi realizado o teste do LCE, e nos dias seguintes o treino e o teste do NF. No período do 12º ao 15º dia foi realizado o teste do CS e do 16º ao 19º dia foi realizado o teste do labirinto aquático. No 20º dia foi realizado o TBS e no 21º dias os animais foram eutanasiados e as estruturas coletadas para análises bioquímicas. O desenho experimental está ilustrado na figura 4.

Figura 4 - Protocolo de Administração i.n. de MPTP e testes comportamentais.



Fonte: A Autora (2018).

6.3 ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP

Foi utilizado o protocolo descrito por (PREDIGER et al., 2006), os animais foram anestesiados com isofluorano 0,96% e em seguida foi realizada a administração i.n. bilateral de MPTP (1 mg/narina). A infusão foi realizada com uma cânula de polietileno (PE 50), conectada a uma micro-seringa de 50 µL (Hamilton, USA) acoplada a uma bomba de infusão (Insight) controlando a taxa de 10 µL/min e o volume total de 10 µL/narina.

Após o procedimento os animais que receberam MPTP formaram o grupo Linhagem+MPTP, e os grupos que receberam a solução de salina formaram o grupo Linhagem+Veículo. Desse modo, com este protocolo obtivemos 6 grupos (n=12 animais/grupo) apresentados no Quadro 3.

Quadro 2 - Grupos experimentais obtidos com o protocolo de administração i.n. de MPTP

Linhagem	Tratamento	
	Veículo	MPTP
Wistar	Wistar-Veículo	Wistar-MPTP
SHR	SHR-Veículo	SHR-MPTP
SLA16	SLA16-Veículo	SLA16-MPTP

## 6.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

### 6.4.1 Teste do Campo Aberto (CA)

Elaborado por Calvin S. Hall em 1932, este teste permite avaliar parâmetros locomotores e relacionados ao comportamento tipo-ansioso. O campo aberto é uma arena de madeira (100 cm x 100 cm) com fundo cinza, onde o animal foi colocado no centro do aparato, em uma sala com luminosidade de 12 lux, e teve 10 minutos para explorar livremente o aparato.

Utilizando o software *Anymaze* foi possível avaliar a distância percorrida total e o tempo de permanência no centro. Sendo o último indicativo de comportamento relacionado a ansiedade.

### 6.4.2 Teste do reconhecimento de objeto (RO)

Este teste tem o objetivo de avaliar memória em modelos animais baseado na diferença de exploração de um objeto familiar versus um objeto novo (ENNACEUR & DELACOUR, 1988). Antes de expor os animais aos objetos, eles passaram por dois dias de habituação (10 min cada) ao campo aberto, para evitar o viés de uma maior exploração do aparato do que dos objetos.

Para avaliar a memória de curta duração os animais foram colocados em uma arena com dois objetos idênticos, a exploração dos mesmos foi avaliada por 5 minutos e caracterizada como a sessão treino. Trinta minutos depois o animal voltou ao aparato para a sessão de teste, onde foi exposto a dois objetos nas mesmas posições utilizadas anteriormente, sendo que um dos objetos era idêntico ao da sessão de treino (objeto familiar) e o segundo objeto era completamente novo ao animal (objeto não familiar), o tempo de exposição na sessão de teste foi de três minutos (Figura 5).

Na sessão treino o parâmetro analisado foi o tempo de exploração dos objetos, se o animal explorou apenas um dos objetos ele era excluído da sessão teste (descrever se algum animal foi excluído). Já na sessão teste o parâmetro de investigação dos objetos foi indicado pelo índice de reconhecimento, calculado pela fórmula

$$\frac{(\text{Tempo objeto não familiar} - \text{Tempo objeto familiar})}{(\text{Tempo objeto não familiar} + \text{Tempo objeto familiar})}$$

Este índice varia entre -1 e 1, sendo valores negativos um indicativo de que o animal não foi capaz de identificar o objeto novo, valores

positivos indicam que o animal explorou mais o objeto novo, e 0 indica que não houve preferência entre os objetos.

Figura 5 - Representação do teste de reconhecimento de objeto.



Legenda: Em verde objeto familiar e em azul o objeto novo. Fonte: a autora (2018)

### 6.4.3 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Com a proposta de avaliar drogas com efeitos tipo-ansio gênico e tipo-ansiolítico, Pellow e colaboradores (1985) elaboraram este teste. O aparato em formato de cruz, com dois braços abertos opostos com uma borda de 1 cm, e dois braços fechados por paredes de 40 cm e todos os braços com 50 cm de comprimento cada. O encontro destes braços forma uma região central de 10 cm x 10 cm (Figura 6).

No protocolo proposto para este projeto, o animal foi colocado no centro do aparato e avaliado por cinco minutos. Durante o teste foram avaliados o tempo de exploração nos braços fechados e abertos e o tempo no centro, além do número de entradas em cada braço. Ao final foi calculado o % de tempo no braço aberto, sendo:

$$\% \text{tempo no braço aberto} = \frac{(\text{Tempo braço aberto} \times 100)}{(\text{Tempo braço aberto} + \text{tempo braço fechado})}, \text{ o}$$

% de entradas no braço aberto também foi calculado:

$$\% \text{entradas no braço aberto} = \frac{(N^{\circ} \text{entradas braço aberto} \times 100)}{(N^{\circ} \text{entradas braço aberto} + N^{\circ} \text{entradas braço fechado})},$$

e o número de entradas nos braços fechados.

Um aumento da exploração dos braços abertos do LCE corresponde a um perfil menos ansioso neste teste.

Figura 6 - Aparato utilizado para a realização do teste do LCE.



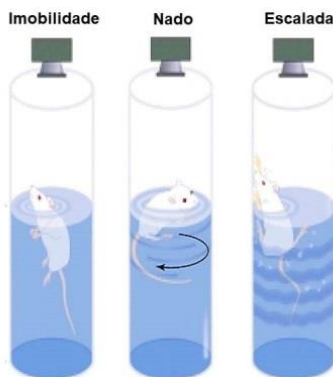
Fonte: A autora (2018)

#### 6.4.4 Teste do nado forçado (NF)

Descrito pela primeira vez por (PORSOLT, LE PICHON & JALFRE, 1977), o teste do nado forçado foi desenvolvido para a avaliação de compostos com atividade antidepressiva e posteriormente passou a ser utilizado para a avaliação de protocolos que induzem comportamentos relacionados à depressão em roedores. Demonstrou-se que quando forçados a nadar em um ambiente onde são impossibilitados de fugir, após um período inicial de comportamentos de nado e escalada das paredes do cilindro, os animais acabam por aceitar a condição imposta, levando à imobilidade, mantendo apenas os movimentos necessários para sustentar a cabeça fora da água. Observou-se que quando tratados com fármacos antidepressivos o tempo que os animais passam imóveis é reduzido.

O teste consistiu em colocar o animal em um cilindro de 30 cm de diâmetro com 45 cm de água ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e avaliar o tempo de nado, de escalada (caracterizado por movimentos paralelos à parede do cilindro) e de imobilidade (Figura 7). Foram necessários dois dias para a realização do teste. No primeiro dia, ou sessão de treino, os animais foram colocados individualmente em um cilindro com água durante 15 minutos. A sessão de teste foi realizada 24 horas depois, onde os animais foram reexpostos ao cilindro com água por 5 minutos, onde os parâmetros mencionados anteriormente foram avaliados.

Figura 7 - Representação do teste do nado forçado e os parâmetros relacionados à depressão analisados.



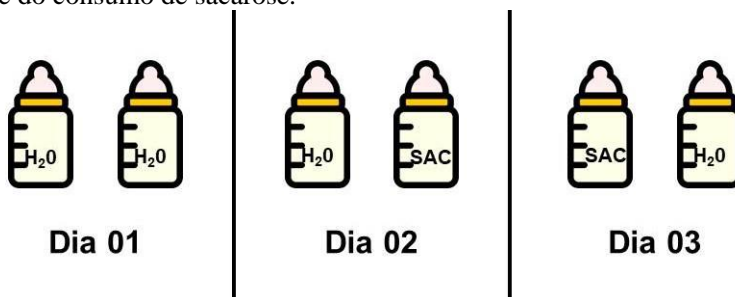
Fonte: Adaptado de (Cryan, Markou, and Lucki 2002).

#### 6.4.5 Teste de consumo de sacarose (CS)

Este protocolo foi adaptado de Pothion e colaboradores (2004) para a utilização da solução de sacarose. Neste teste, os animais foram isolados em caixas (17 x 26 x 14 cm) com comida e duas garrafas de água *ad libitum*. Após um intervalo de 24 horas foi mensurado o consumo de água de cada animal (em gramas), e uma das garrafas de água foi trocada por uma garrafa com solução de sacarose 0,8%. No dia seguinte as garrafas foram pesadas novamente, a posição das garrafas na caixa foi trocada e 24 horas depois foram pesadas novamente e os animais voltaram para as caixas moradia (Figura 8). O consumo de sacarose é mensurado a partir da média do consumo de sacarose nos dois dias de teste.

Este teste teve o intuito de avaliar o comportamento tiponanedônico do animal associado ao consumo de uma substância palatável, sendo observado que quanto mais evidente este comportamento, menor será seu consumo/preferência pela sacarose.

Figura 8 - Representação da disposição dos bebedouros ao longo do teste do consumo de sacarose.

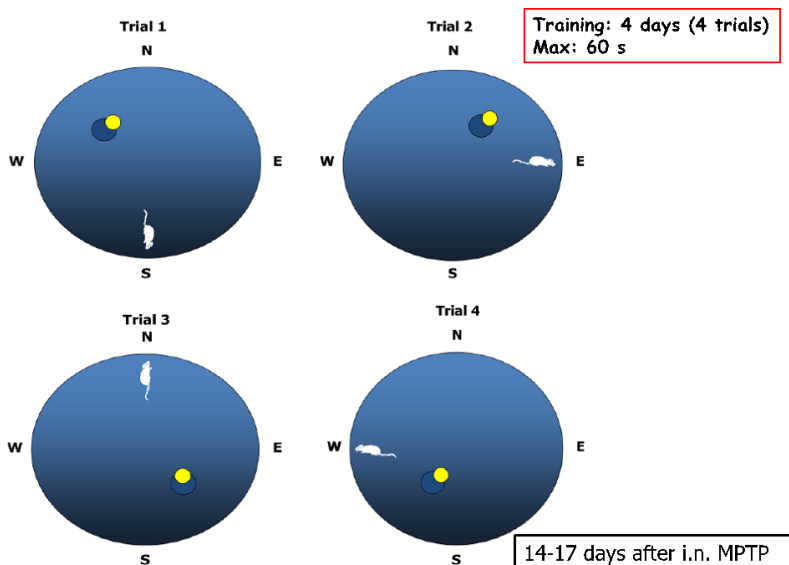


Legenda H<sub>2</sub>O: Água e SAC: Sacarose 0,8%. Fonte: a autora (2018)

#### 6.4.6 Labirinto aquático (versão memória de procedimento)

Descrito pela primeira vez por Morris e colaboradores (1982), no teste do labirinto aquático o animal deve encontrar uma plataforma (10 x 10 cm) submersa (1,5 cm abaixo da água) que está sinalizada por uma pista visual (Figura 9). A sua versão adaptada (memória de procedimento) consistiu em quatro dias de teste e quatro sessões por dia, em cada sessão o animal foi colocado em um ponto diferente do tanque (1,7 x 0,8 m) e a plataforma mudada de posição. O animal teve 60 segundos para encontrar a plataforma em cada sessão, sendo que após encontrá-la era mantido durante 15 segundos sobre a mesma. Caso não encontrasse, a plataforma era indicada para o animal até que este nadasse até ela. A latência para encontrar a plataforma foi utilizada como parâmetro de aprendizado.

Figura 9 - Ilustração do teste do labirinto aquático e as coordenadas do tanque.



Legenda: N: Norte, NE: Nordeste, L: Leste, SE: Sudeste, S: Sul, SO: Sudoeste, O: Oeste, NO: Noroeste. Fonte: PREDIGER et al., 2009.

#### 6.4.7 Teste da borrifada de sacarose (BS)

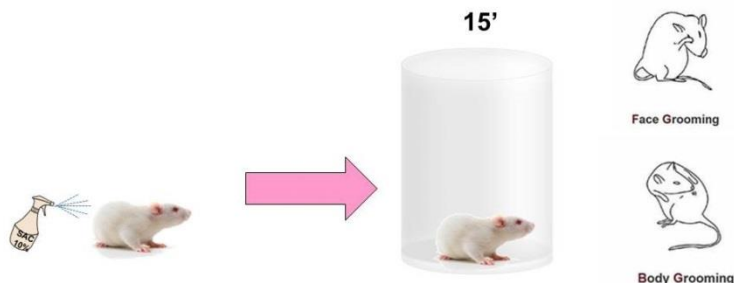
O teste da borrifada de sacarose (ou em inglês, *splash test*) teve o objetivo de avaliar o comportamento tipo-anedônico e de autocuidado nos animais. Para isso, borrifou-se uma solução de sacarose 10% no dorso do animal, devido a sua viscosidade a solução deixa o pelo pegajoso, criando uma situação de desconforto, levando o animal a realizar a autolimpeza (SANTARELLI et al., 2003; ISINGRINI et al., 2010).

Depois de aplicada a sacarose, o animal foi colocado em um cilindro de acrílico transparente em sala com 12 lux de luminosidade. O teste teve duração de 15 minutos sendo avaliados dois parâmetros (Figura 10). O primeiro foi a latência para realização do primeiro comportamento de autolimpeza (*grooming*), considerado como o primeiro momento em que o animal entra em contato com a solução de sacarose borrifada em seu dorso. E o segundo parâmetro foi o tempo total de autolimpeza ao longo do teste. Quanto maior a latência para



iniciar o comportamento de autolimpeza e quanto menor o tempo deste comportamento, entende-se que há um maior comportamento tipo-anedônico e um menor autocuidado.

Figura 10 - Representação do teste da borrifada de sacarose.



Legenda: SAC 10%: Sacarose 10%. Fonte: a autora (2018)

## 6.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 6.5.1 Preparo das amostras

Após a realização dos testes comportamentais, no 21º dia após a administração i.n. do MPTP, as ratas foram anestesiadas com isoflurano e ortotanasiadas por decapitação. As regiões encefálicas do bulbo olfatório, córtex pré-frontal e estriado foram dissecadas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram homogeneizadas em solução de SDS 5% com inibidor de protease (1:100), ortovanadato (1:200) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF; 1:200). E em seguida foi realizada a quantificação de proteína para cada estrutura pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Com os resultados obtidos normalizou-se as amostras para uma concentração de proteína de  $2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$  adicionando tampão de amostra 6 vezes concentrado e água MiliQ, ao fim as amostras foram fervidas por 20 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$ .

### 6.5.2 Imunodeteção de Proteínas (*Western blotting*)

Utilizou-se um gel de poliacrilamida 17%, e  $20\text{ }\mu\text{g}$  de cada amostra foi separada por eletroforese. Em seguida, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, por 90 minutos e a amperagem calculada de acordo com o

número de membranas. Em seguida as membranas foram bloqueadas com solução de TBS-T contendo leite em pó a 5%, e então incubadas *overnight* com os anticorpos primários de interesse diluídos em solução de TBS-T com leite em pó 1%. Após três lavagens com TBS-T adicionou-se os anticorpos secundários de interesse associados a peroxidase. Para a leitura das bandas utilizou-se um kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) no fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad, La Jolla, USA). As bandas detectadas foram quantificadas com auxílio do software ImageLab™ (Bio-Rad, La Jolla, USA).

Os anticorpos utilizados foram anti-goat anti-TH (1:200, ab112, abcam) e anti-mouse anti-DAT (1:500, sc 1433, cell signalling). Para controle do carregamento detectou-se a proteína  $\beta$ -actina com anticorpo primário anti- $\beta$ -actina conjugado a peroxidase (1:50000, A3854, Sigma-Aldrich).

Quadro 3 - Proteínas quantificadas e região encefálica com a técnica bioquímica de *western blotting*

Marcador	Peso Molecular	Região encefálica
DAT	69 kDa	Estriado
Tirosina Hidroxilase	62 kDa	Estriado
$\beta$ -actina	42 kDa	Estriado

## 6.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados obtidos foram avaliados quanto a sua normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Com exceção dos índices de reconhecimento de objeto e a latência para encontrar a plataforma no labirinto aquático, os demais parâmetros (comportamentais e bioquímicos) foram avaliados com a análise de variância (ANOVA) utilizando os fatores linhagem (Wistar, SHR ou SLA16) e tratamento (veículo ou MPTP) como variáveis independentes. Os índices de reconhecimento de objetos foram comparados ao valor teórico de 0 segundo teste *t* de Student. E a latência para encontrar a plataforma nos quatro dias de teste do labirinto aquático foi avaliada com uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Para a análise estatística foi utilizado o software STATISTIC 7.0 e valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

## 7 RESULTADOS

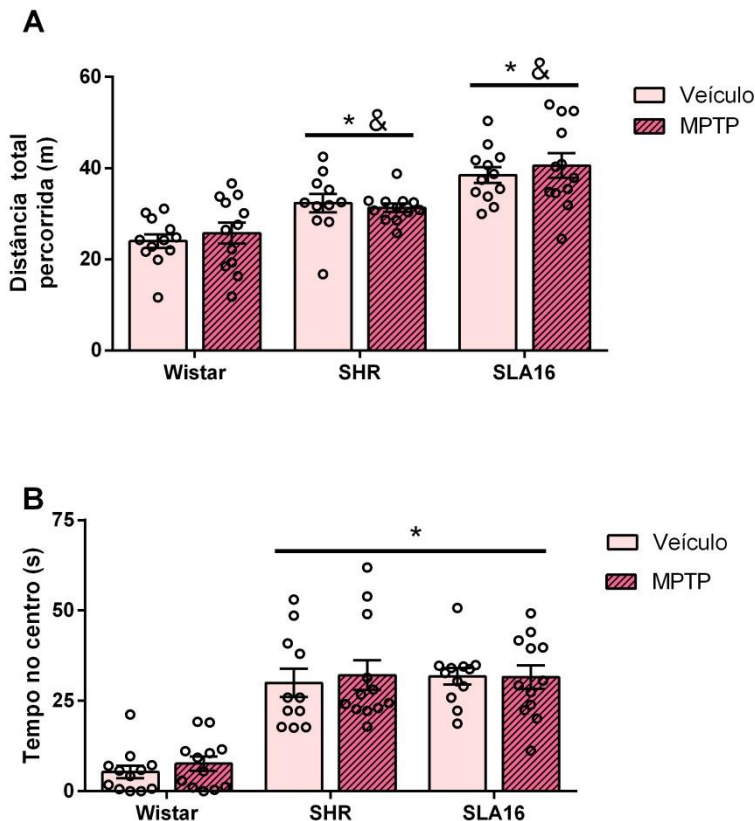
### 7.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 7.1.1 Teste do Campo Aberto

A ANOVA de duas vias indicou valores significativos para o fator linhagem na distância total percorrida pelos animais no aparato do ( $F_{(2,65)}=28,671$ ;  $p<0,0001$ ). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que as linhagens SHR e SLA16 apresentaram maior locomoção em comparação a linhagem Wistar, sendo que a linhagem SLA16 também diferiu da linhagem SHR (Figura 11A). A ANOVA não apresentou efeito do fator tratamento e da interação entre eles, indicando que a administração i.n. de MPTP não alterou este parâmetro em nenhuma das três linhagens.

Quanto ao tempo no centro, a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo para o fator linhagem ( $F_{(2,64)}=48,2961$ ;  $p<0,0001$ ). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que as linhagens SHR e SLA16 apresentam maior tempo de permanência na área central (aversiva) do aparato em relação a linhagem Wistar (Figura 11B). Novamente não houve efeito significativo do fator tratamento ou de sua interação com o fator linhagem, desse modo a administração i.n. de MPTP não foi capaz de alterar este comportamento relacionado à ansiedade em nenhuma das linhagens investigadas.

Figura 11 - Diferenças entre as linhagens e avaliação do efeito da administração i.n. de MPTP sobre os parâmetros de locomoção e ansiedade avaliados no teste do campo aberto.



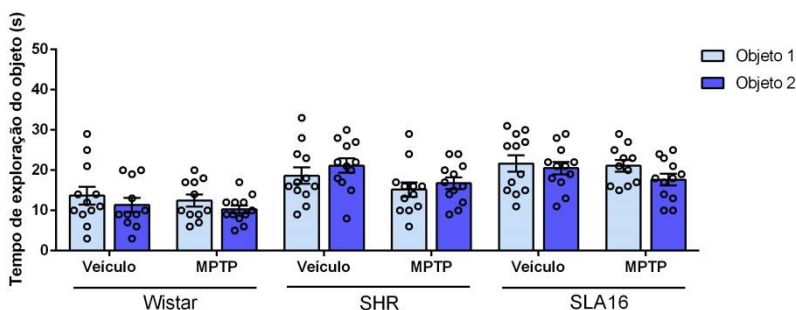
Legenda: (A) Distância total percorrida em cinco minutos de teste; (B) Tempo de permanência no centro do aparato. \* $p < 0,05$  vs. linhagem Wistar, & $p < 0,05$  vs. linhagem isogênica (SHR ou SLA16), de acordo com ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Barras representam as médias  $\pm$  e.p.m.,  $n=11-12$  animais/grupo.

### 7.1.2 Teste de reconhecimento de objetos

Para avaliar se houve preferência por um dos objetos apresentados na sessão de treino, realizou-se o teste *t* de Student para comparar o tempo de exploração de cada objeto nas três linhagens. O

teste estatístico não apresentou diferenças significativas entre o tempo de exploração dos objetos (Wistar-veículo:  $t=0,94$ ;  $p=0,349$ ; Wistar-MPTP:  $t=0,89984$ ;  $p=0,3699$ ; SHR-veículo:  $t=1,04337$ ;  $p=0,2987$ ; SHR-MPTP:  $t=0,6608$ ;  $p=0,5099$ ; SLA16-veículo:  $t=0,4869$ ;  $p=0,6272$ ; SLA16-MPTP:  $t=1,3978$ ;  $p=0,1646$ ), indicando que todos os grupos exploraram de maneira semelhante os dois objetos (Figura 12).

Figura 12 - Tempo de exploração dos objetos na sessão de treino no teste do reconhecimento de objetos.

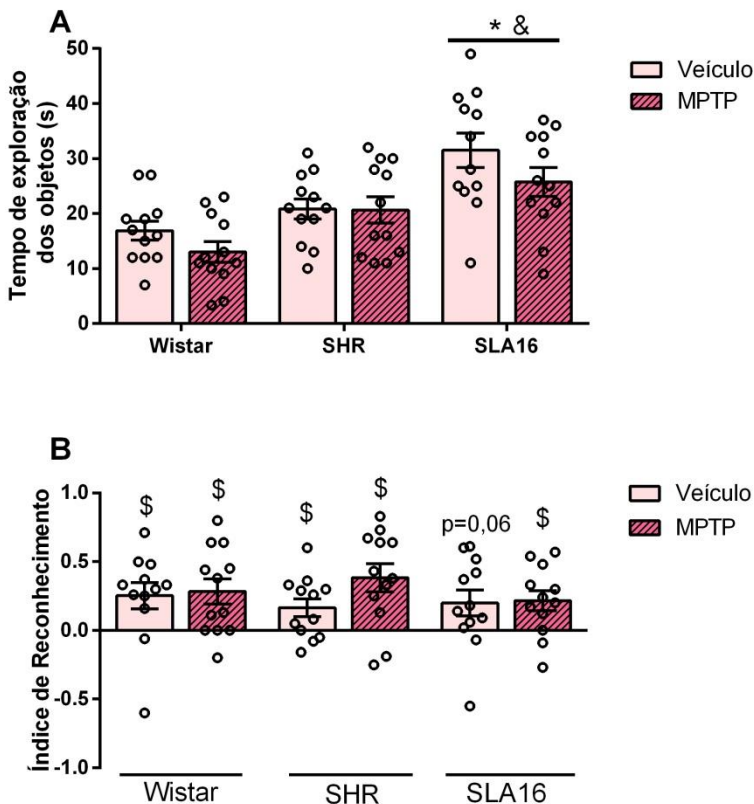


Legenda: Barras representam as médias  $\pm$  e.p.m.,  $n=11-12$  animais/grupo.

Na sessão de teste, a ANOVA de duas vias revelou um efeito para o fator linhagem no tempo total de exploração dos objetos ( $F_{(2,66)}=17,5542$ ;  $p=0,000$ ), o teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que a linhagem SLA16 apresentou um maior tempo de exploração dos objetos em relação as linhagens Wistar e SHR (Figura 13A).

Quanto à capacidade cognitiva dos animais em discriminar o objeto novo do objeto familiar, o teste *t* de Student comparado ao valor teórico de 0 indicou que as três linhagens, independente do tratamento (veículo ou MPTP), discriminaram os dois objetos (Wistar-veículo:  $t=5,538$ ;  $p=0,0002$ ; Wistar-MPTP:  $t=3,079$ ;  $p=0,0105$ ; SHR-veículo:  $t=2,540$ ;  $p=0,0275$ ; SHR-MPTP:  $t=3,782$ ;  $p=0,0030$ ; SLA16-veículo:  $t=2,079$ ;  $p=0,0618$ ; SLA16-MPTP:  $t=2,946$ ;  $p=0,0133$ ) (Figura 13B).

Figura 13 - Diferenças entre as linhagens e avaliação do efeito da administração i.n. de MPTP no teste de reconhecimento do objeto.



Legenda: (A) Tempo de exploração total dos objetos; (B) Índice de reconhecimento dos objetos. \* $p < 0,05$  vs linhagem Wistar, & $p < 0,05$  vs linhagem SHR, segunda ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls. \$ $p < 0,05$  vs. valor teórico de 0, de acordo com teste *t* de Student. Barras representam as médias  $\pm$  e.p.m.,  $n=11-12$  animais/grupo.

### 7.1.3 Teste do labirinto em cruz elevada

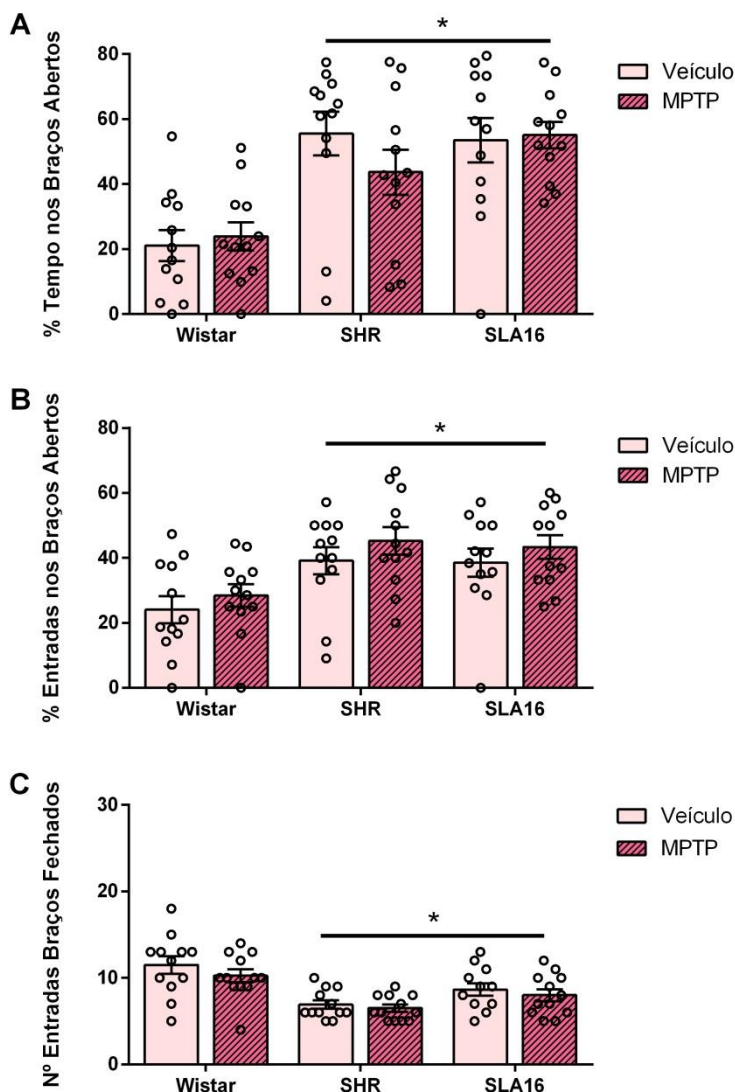
No teste do LCE a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do fator linhagem no percentual de tempo gasto pelos

animais nos braços abertos ( $F_{(2,66)} = 17,7686$ ;  $p < 0,0001$ ). Posterior teste de Newman-Keuls indicou que as fêmeas das linhagens SHR e SLA16 permanecem mais tempo nos braços abertos em comparação com as fêmeas da linhagem Wistar (Figura 14A).

A ANOVA de duas vias também revelou efeito significativo para o fator linhagem no percentual de entradas nos braços abertos ( $F_{(2,66)} = 9,6730$ ;  $p = 0,002$ ). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que as linhagens SHR e SLA16 apresentam um maior percentual de entradas nos braços abertos em relação a linhagem Wistar (Figura 14B). Em nenhum destes parâmetros houve efeito do fator tratamento ou de sua interação com o fator linhagem, indicando que a administração i.n. de MPTP não induziu comportamentos relacionados à ansiedade em ratas destas linhagens.

Quanto ao número de entradas nos braços fechados, a ANOVA de duas vias indicou efeito do fator linhagem ( $F_{(2,66)} = 17,6486$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou uma redução no número de entradas nos braços fechados do LCE nas linhagens SHR e SLA16 em comparação a linhagem Wistar (Figura 14C). A ANOVA não indicou efeito para o fator tratamento nem para a interação (linhagem x tratamento), o que indica que os animais que receberam MPTP (i.n.) não sofreram alterações em sua atividade locomotora.

Figura 14 - Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre os comportamentos relacionados à ansiedade em ratos das linhagens Wistar, SHR e SLA16 avaliados no teste do LCE.



Legenda: (A) percentual do tempo de permanência nos braços abertos, (B) percentual do número de entradas nos braços abertos, (C) número de entradas



nos braços fechados. \* $p < 0,05$  vs. linhagem Wistar, segundo ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Barras representam as médias  $\pm$  e.p.m.,  $n = 12$  animais/grupo.

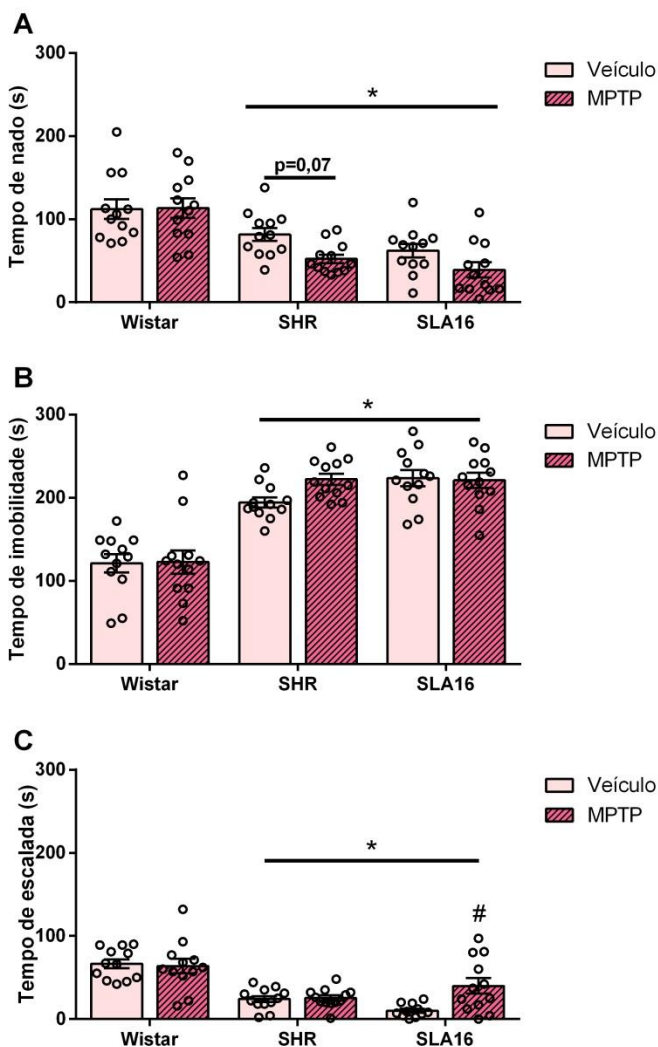
#### 7.1.4 Teste do nado forçado

Para o parâmetro tempo de nado, a ANOVA de duas vias revelou efeitos significantes dos fatores linhagem ( $F_{(2,66)} = 24,3885$ ;  $p < 0,0001$ ) e tratamento ( $F_{(1,66)} = 5,1526$ ;  $p = 0,026$ ), mas não houve efeito significativo da interação entre eles. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que as linhagens SHR e SLA16 apresentam um menor tempo de nado em comparação a linhagem Wistar. Além disso, os animais da linhagem SHR que receberam a administração i.n. de MPTP apresentaram uma redução no tempo de nado próxima a significância ( $p = 0,07$ ) em relação aos animais da mesma linhagem tratados com veículo, sugerindo um possível comportamento do tipo depressivo induzido pelo MPTP em ratas SHR (Figura 15A).

A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do fator linhagem no parâmetro tempo de imobilidade ( $F_{(2,66)} = 62,609$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que as fêmeas das linhagens SHR e SLA16 apresentam maior tempo de imobilidade neste teste quando comparadas com as fêmeas da linhagem Wistar. Para este parâmetro, a ANOVA de duas vias não indicou efeito significativo do fator tratamento ou da interação linhagem x tratamento (Figura 15B).

Quanto ao tempo de escalada, a ANOVA de duas vias indicou efeitos significativos do fator linhagem ( $F_{(2,65)} = 28,7228$ ;  $p < 0,0001$ ) e do fator de interação linhagem x tratamento ( $F_{(2,65)} = 4,0446$ ;  $p = 0,022$ ). O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que as linhagens SHR e SLA16 apresentam menor tempo de escalada quando comparadas a linhagem Wistar. Observou-se também que os animais da linhagem SLA16 que receberam MPTP pela via i.n. apresentaram um aumento no tempo de escalada quando comparados ao seu grupo controle (SLA16-veículo), indicando que a toxina foi capaz de alterar parâmetros de emocionalidade nesta linhagem (Figura 15C).

Figura 15 - Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre os comportamentos relacionados à depressão em ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 avaliados no teste do NF.



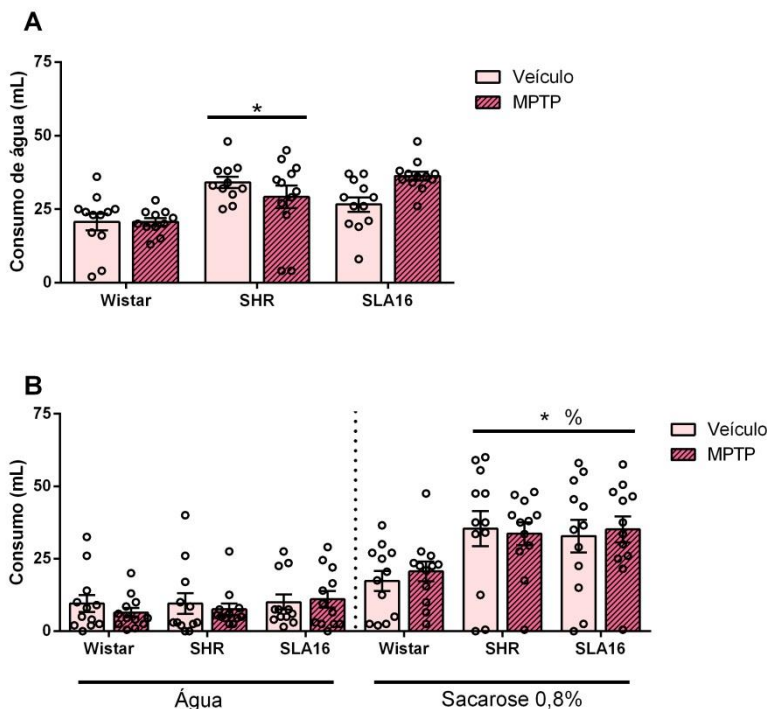
Legenda: (A) tempo de nado, (B) tempo de imobilidade, (C) tempo de escalada. \* $p<0,05$  vs. linhagem Wistar, # $p<0,05$  vs. respectivo controle, de acordo com ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Barras representam as médias  $\pm$  e.p.m.,  $n=11-12$  animais/grupo.

### 7.1.5 Teste do consumo de sacarose

Na sessão de treino, a ANOVA de duas vias indicou efeitos significativos para os fatores linhagem ( $F_{(2,64)}=12,4393$ ;  $p<0,0001$ ) e interação linhagem x tratamento ( $F_{(2,64)}=4,4367$ ;  $p=0,016$ ). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que a linhagem SHR apresenta maior consumo de água quando comparada a linhagem Wistar, e que os animais da linhagem SHR que receberam a administração i.n. de MPTP tiveram um maior consumo de líquido quando comparado aos animais da mesma linhagem que receberam a solução veículo (Figura 16A).

Para a sessão de teste foi realizada uma ANOVA multifatorial (três vias) que revelou efeitos significativos para os fatores linhagem ( $F_{(2,132)}=6,6403$ ,  $p=0,002$ ), consumo ( $F_{(1,132)}=85,1451$ ;  $p=0,000$ ) e a interação dos dois fatores, linhagem x consumo, ( $F_{(2,132)}=4,4911$ ;  $p=0,013$ ), não houve efeito significativo para o fator tratamento e nenhuma de suas interações. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que as linhagens SHR e SLA16 apresentaram maior consumo de sacarose em relação a linhagem Wistar. As linhagens isogênicas também apresentaram preferência pela solução de sacarose quando comparado com o consumo de água, enquanto a linhagem Wistar não apresentou preferência pela solução de sacarose (Figura 16B).

Figura 16 - Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre os comportamentos relacionados à anedonia em ratos das linhagens Wistar, SHR e SLA16 avaliados no teste do CS.

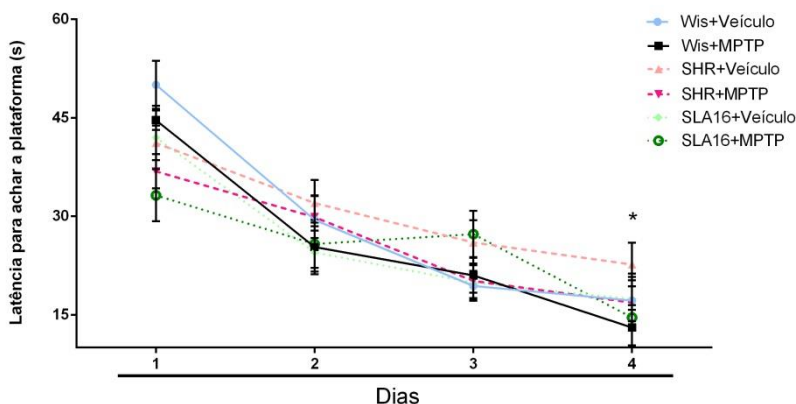


Legenda: (A) consumo de água na sessão de treino, (B) consumo de líquidos (água e sacarose) na sessão de teste. \* $p < 0,05$  vs. linhagem Wistar; % $p < 0,05$  vs. consumo de água, de acordo com ANOVA de duas vias (A) e multifatorial (B), seguido de teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

### 7.1.6 Labirinto aquático – versão memória de procedimento

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeitos significativos do fator repetição ( $F_{(3,183)}=69,794$ ;  $p < 0,0001$ ) e da interação linhagem x repetição ( $F_{(6,183)}=2,290$ ;  $p=0,038$ ). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que todos os grupos apresentaram uma curva de aprendizado, indicado pela redução significativa na latência média para encontrar a plataforma no último dia comparada com a do primeiro dia de teste (Figura 17).

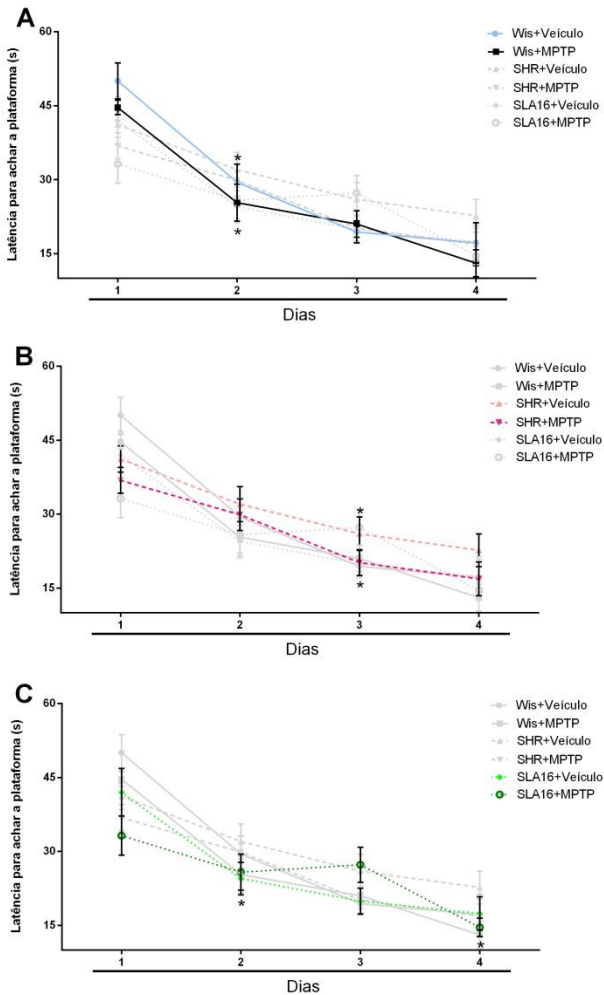
Figura 17 - - Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a memória de procedimento em ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 avaliados no teste do labirinto aquático.



Legenda: \* $p < 0,05$  vs. Dia 01 do mesmo grupo segundo ANOVA de medidas repetidas seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls. Barras representam as médias  $\pm$  e.p.m.,  $n=11-12$  animais/grupo.

Quando analisamos detalhadamente os resultados do teste *post-hoc*, observamos diferenças no processo de aprendizado. A linhagem Wistar e os animais da linhagem SLA16 que receberam a administração i.n. de veículo aprenderam a tarefa no segundo dia de teste (indicado pela diferença estatística entre o primeiro e o segundo dia (Figura 18 A, C)). Já a linhagem SHR aprendeu a tarefa apenas no terceiro dia (Figura 18B). Finalmente, as fêmeas da linhagem SLA16 que receberam MPTP (i.n.) aprenderam a tarefa apenas no último dia de teste, sendo indicativo de um prejuízo no aprendizado desta tarefa causado pelo MPTP nesta linhagem (Figura 18C).

Figura 18 - Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a memória de procedimento em ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 avaliados separadamente no teste do labirinto aquático.



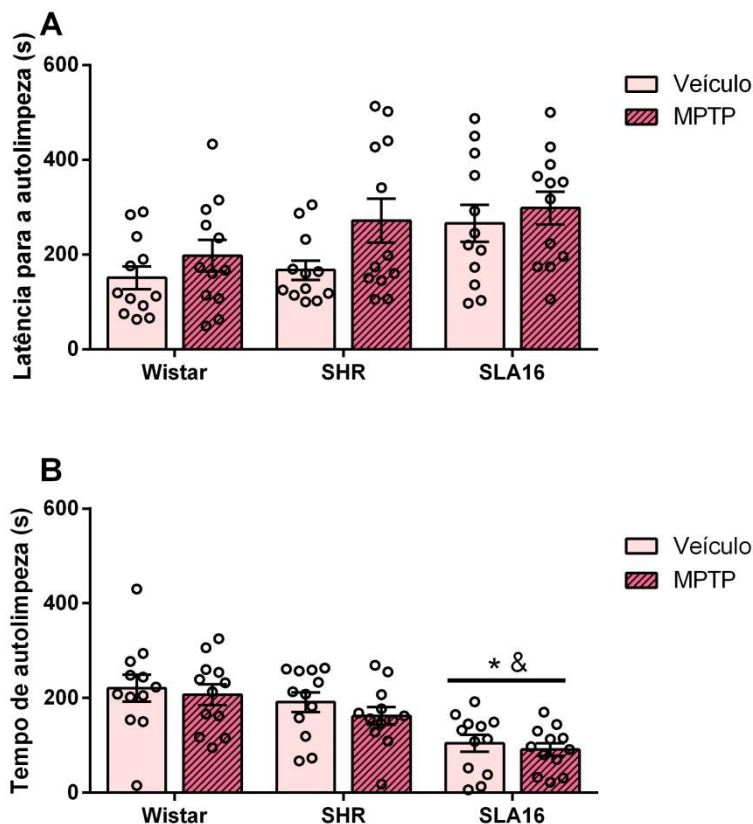
Legenda: (A) Latência para encontrar a plataforma na linhagem Wistar, (B) Latência para encontrar a plataforma na linhagem SHR, (C) Latência para encontrar a plataforma na linhagem SLA16. \* $p < 0,05$  vs. Dia 01 do mesmo grupo segundo ANOVA de medidas repetidas seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls. Barras representam as médias  $\pm$  e.p.m.,  $n=11-12$  animais/grupo.

### 7.1.7 Teste da Borrifada de Sacarose

A ANOVA de duas vias para o parâmetro latência para iniciar a autolimpeza indicou efeitos significativos para os fatores linhagem ( $F_{(2,66)}=5,0497$ ;  $p=0,009$ ) e tratamento ( $F_{(1,66)}=4,814$ ;  $p=0,031$ ), mas não para a interação entre eles. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls não indicou diferenças significativas entre os grupos (Figura 19A).

Quanto ao tempo de autolimpeza, a análise estatística revelou efeito significativo para o fator linhagem ( $F_{(2,66)}=16,346$ ;  $p<0,0001$ ). Posterior teste de Newman-Keuls *revelou* que a linhagem SLA16 apresenta menor tempo de autolimpeza em relação as linhagens Wistar e SHR (Figura 19B).

Figura 19 - Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre os comportamentos relacionados à anedonia e autocuidado em ratas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 avaliados no teste da borrfada de sacarose.



Legenda: (A) Latência para iniciar o comportamento de autolimpeza, (B) Tempo realizando a autolimpeza. \* $p < 0,05$  vs. linhagem Wistar, & $p < 0,05$  vs. linhagem SLA16, segundo ANOVA de duas vias seguido de teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Barras representam as médias  $\pm$  e.p.m.,  $n = 12$  animais/grupo.



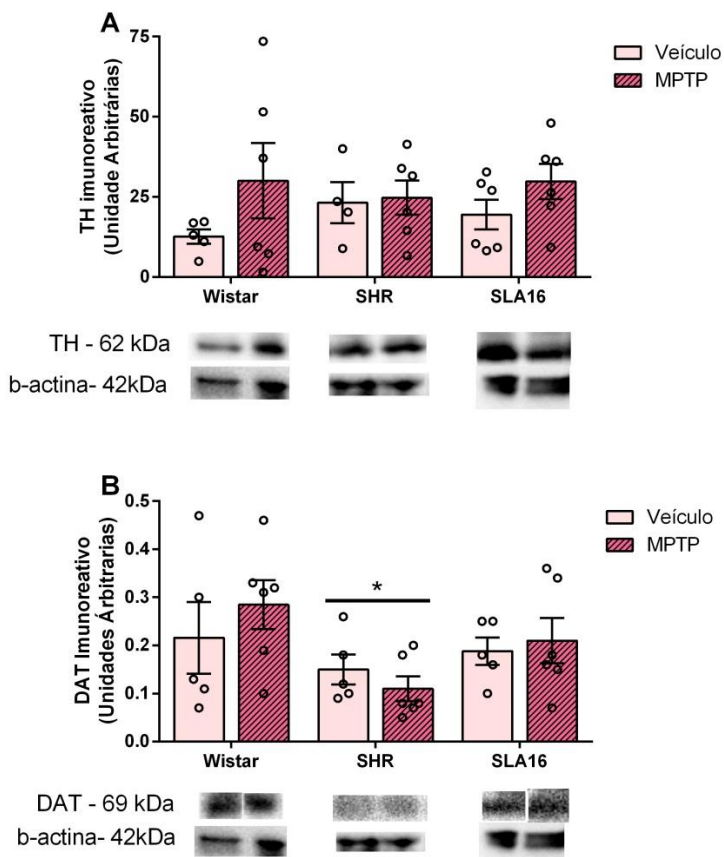
## 7.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 7.2.1 Imunoconteúdo de tirosina hidroxilase (TH) e transportador de dopamina (DAT) no estriado

A ANOVA de duas vias não indicou efeito significativo para nenhum dos fatores analisados referentes ao imunoconteúdo de TH no estriado dos animais (Figura 20A).

A análise estatística para o imunoconteúdo de DAT no estriado dos animais indicou efeito significativo do fator linhagem ( $F_{(2,27)}=3,4561$ ;  $p=0,046$ ), não houve efeito significativo para o fator tratamento nem para a interação dos fatores linhagem x tratamento. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que ratas da linhagem SHR (independente do tratamento) apresentaram redução nos níveis de DAT no estriado em relação a linhagem controle Wistar (Figura 20B).

Figura 20 - Efeito da administração i.n. de MPTP sobre o imunoconteúdo e TH e DAT no estriado das linhagens.



Legenda: (A) Imunoconteúdo de TH no estriado, (B) Imunoconteúdo de DAT no estriado. \* $p < 0,05$  vs Wistar segundo ANOVA de fatores principais seguido de teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Barras representam as médias  $\pm$  e.p.m.,  $n = 4-6$  animais/grupo.

## 8 DISCUSSÃO

Transtornos de humor e ansiedade, além de serem sintomas não motores da DP, quando desenvolvidos na vida adulta podem aumentar o risco do paciente desenvolver a DP (ZHU, VAN HILTEN & MARINUS, 2017; DALLÉ & MABANDLA, 2018). Neste trabalho avaliamos se as alterações emocionais e genéticas observadas nas linhagens SHR e SLA16 as tornariam mais susceptíveis aos efeitos do MPTP, demonstrando uma interação entre fatores genéticos (linhagens) e fatores ambientais (MPTP i.n.) para o desenvolvimento da DP.

Estudos demonstraram que as linhagens SHR e SLA16 apresentam maior atividade locomotora quando comparadas as linhagens Wistar Kyoto e Lewis, observada no campo aberto e na caixa de atividade, e que expostos a situações novas animais da linhagem SLA16 tendem a apresentar maior locomoção do que a linhagem SHR (DE MEDEIROS et al., 2013; ANSELMi et al., 2016; GRANZOTTO, 2016).

No teste do CA foi possível observar a atividade locomotora dos animais com o parâmetro de distância percorrida, e também o perfil emocional dos animais com o tempo de permanência na área central. Corroborando com trabalhos anteriores (DE MEDEIROS et al., 2013; ANSELMi et al., 2016; DOS ANJOS, 2017), as linhagens SHR e SLA16 diferiram na distância total percorrida no aparato. As linhagens isogênicas também apresentam maior locomoção no aparato em relação a linhagem Wistar.

A administração i.n. de MPTP não alterou a locomoção das linhagens no CA. Trabalhos prévios demonstraram que o mesmo protocolo de administração da toxina também não afeta a locomoção de ratos Wistar machos nos primeiros dias após a administração i.n. de MPTP (PREDIGER et al., 2006, 2011; MOREIRA et al., 2010).

Estudos anteriores mostraram que as fêmeas da linhagem SLA16 permanecem mais tempo na área central do CA em relação a linhagem SHR (DE MEDEIROS et al., 2013; ANSELMi et al., 2016; DOS ANJOS, 2017). No entanto, neste trabalho não se observou diferenças entre estas as linhagens SHR e SLA16 para o parâmetro tempo no centro. Por outro lado, corroborando com a literatura que relata menor perfil tipo-ansioso das linhagens SHR e SLA16 em virtude dos efeitos do QTL *Anxrr-16* (DE MEDEIROS et al., 2014), ratas destas linhagens isogênicas apresentaram maior tempo de permanência na área central em relação a linhagem Wistar (Figura 11B). Estudos anteriores haviam mostrado este perfil das linhagens SHR e SLA16 apenas em

comparação a linhagem LEW (CHIAVEGATTO et al., 2009; DE MEDEIROS et al., 2014; ANSELMi et al. 2016), sendo que o presente estudo é o pioneiro em demonstrar este perfil em comparação com uma linhagem diferente.

O teste do LCE também se baseia em respostas emocionais dos animais na exploração do aparato. Trabalhos anteriores comparando as linhagens isogênicas mostraram que ambas exploram mais as áreas aversivas do aparato (braços abertos) e que a linhagem SLA16 permanece ainda mais tempo e tem um número maior de entradas nos braços abertos do que a linhagem SHR (CORVINO, 2015; DOS ANJOS, 2017). Este trabalho demonstrou que, comparadas com a linhagem Wistar, as fêmeas das linhagens isogênicas apresentaram maior tempo de exploração dos braços abertos, maior percentual de entradas nos mesmos e redução no número de entradas nos braços fechados. Corroborando com o menor perfil menos ansioso e mais impulsivo das linhagens, e com os resultados do tempo de exploração da área central do CA.

Entretanto, estes dados vão de encontro aos trabalhos anteriores ao não observar diferenças entre as linhagens. No entanto, devem ser destacadas algumas diferenças metodológicas em relação aos estudos anteriores. O trabalho de Corvino (2015) utilizou ratos machos destas linhagens e expressou o tempo em segundos de exploração dos braços abertos, enquanto neste trabalho os dados foram expressos em percentual do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos, o mesmo para o número de entradas nos braços abertos. O trabalho de Dos Anjos (2017), o qual comparou fêmeas das linhagens isogênicas expressou os dados semelhantes a este trabalho, no entanto o aparato está acoplado a outros dois aparatos e não especifica se são realizados separadamente e o tempo que o animal tem para explorar o aparato, o que dificulta na comparação dos dados.

A administração i.n. de MPTP não alterou o tempo de permanência na área central do CA, o percentual de tempo e entradas nos braços abertos, nem o número de entradas nos braços fechados do LCE. Estes resultados indicam que a toxina não influenciou os comportamentos relacionados à ansiedade em ratas das três linhagens (Figura 14). Os trabalhos presentes na literatura utilizando neurotoxinas para induzir um modelo de DP, não são conclusivo quanto aos efeitos das toxinas no comportamento tipo-ansioso dos animais. Os efeitos variam e acordo com a dose e forma de administração da toxina (Prediger et al. 2012). A injeção intraestriatal bilateral de 6-OHDA em

machos das linhagens SHR e SLA16 induziu comportamento tipo-ansioso nas linhagens (FADANNI, 2018).

Não há registro na literatura de trabalhos que tenham comparado o comportamento das fêmeas das linhagens SHR e SLA16 no teste do NF. Quando comparado o comportamento das fêmeas SHR e SLA16 com o comportamento dos machos da mesma linhagem e mesma idade neste teste, nota-se que as fêmeas apresentam maior tempo de imobilidade, menor tempo de nado e tempos iguais de escalada (FADANNI, 2018). Em relação a linhagem Wistar, as linhagens isogênicas apresentam maior tempo de imobilidade, menor tempo de nado e de escalada, indicando que as fêmeas das linhagens SHR e SLA16 possuem comportamento tipo-depressivo quando comparadas as fêmeas da linhagem Wistar.

A linhagem SHR (machos e fêmeas) apresenta menor tempo de imobilidade quando comparada a linhagem LEW, conhecida pelo perfil de emocionalidade tipo-depressivo (HINOJOSA et al., 2006). Nos testes do CA e LCE a linhagem Wistar parece ter um comportamento semelhante a linhagem LEW, poderíamos esperar que o mesmo padrão fosse observado no teste do NF. No entanto, não encontramos isso, o que poderia indicar que as regiões genômicas diferenciais das linhagens LEW, SHR e SLA16 podem estar envolvidas com o comportamento das mesmas neste teste.

Diversos trabalhos já avaliaram o comportamento de ratos (machos e fêmeas) da linhagem Wistar no teste do NF. No entanto, não é possível concluir se as fêmeas apresentam maior ou menor tempo de imobilidade em comparação aos machos, uma vez que, além do fator idade, a altura e diâmetro do cilindro, e o volume de água e a temperatura da mesma alteram o comportamento observado neste teste (KOKRAS et al., 2015). Quando comparado com trabalhos já realizados em nosso laboratório observamos que as fêmeas Wistar apresentam maior tempo de imobilidade e menor tempo de nado (CASTRO et al., 2012; MOREIRA et al., 2010).

Nosso grupo já demonstrou que a administração i.n. de MPTP (0,1 ou 1 mg/kg), é capaz de induzir alterações emocionais no teste do NF em camundongos C57BL/6, machos e fêmeas, e em ratos Wistar machos, levando a um aumento no tempo de imobilidade destes animais (MOREIRA et al., 2010; CASTRO et al., 2012; SCHAMNE et al., 2018). No entanto, o mesmo protocolo foi utilizado neste trabalho e não observamos efeito da toxina em nenhum parâmetro do NF em fêmeas da linhagem Wistar. Estes resultados indicam que estas podem ser resistentes aos efeitos da administração i.n. de MPTP. Estudos têm

demonstrado que as diferenças de gêneros na susceptibilidade aos efeitos de diversas neurotoxinas podem ser explicadas pela ação dos hormônios sexuais, sendo o estrogênio um candidato a neuroproteção em fêmeas (BOURQUE, DLUZEN & DI, 2009; BOURQUE, DLUZEN & PAOLO, 2011; JURADO-CORONEL et al., 2017).

Adicionalmente, observou-se uma tendência do MPTP em reduzir o tempo de nado em ratas SHR. No entanto, não foram observadas alterações significativas nos outros dois parâmetros (tempo de imobilidade e tempo de escalada) neste grupo.

Já as fêmeas da linhagem SLA16 tratadas com MPTP i.n. apresentaram um aumento significativo no tempo de escalada em relação ao seu controle, contudo não houve redução significativa no tempo de nado e nenhuma alteração no tempo de imobilidade (Figura 15). Estudos demonstraram que os parâmetros de nado e imobilidade no NF sofrem influência da neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica, enquanto que o parâmetro de escalada é mais influenciado pela neurotransmissão noradrenérgica (DETKE, RICKELS & LUCKI, 1995; DETKE & LUCKI, 1996).

Devido a relativa seletividade do MPTP pelos neurônios dopaminérgicos (SMEYNE & JACKSON-LEWIS, 2005), esperava-se alterações no tempo de imobilidade e nado. No entanto, em outros modelos animais, já se observou alterações noradrenérgicas induzidas pela administração de MPTP (MASILAMONI & SMITH, 2018). Além disto, existem mais de 1000 genes na região genômica diferencial da linhagem SLA16 e alguns deles podem estar relacionados com a neurotransmissão noradrenérgica e com respostas emocionais (DE MEDEIROS et al., 2014). Este resultado pode indicar um possível efeito do MPTP em virtude desta região genômica diferencial, uma vez que as respostas observadas nas linhagens SHR e SLA16 foram distintas entre si. Neste sentido, experimentos adicionais de dosagem de monoaminas (DA, noradrenalina e serotonina) e seus metabólitos em diferentes áreas encefálicas por HPLC após a administração i.n. de MPTP em ratas destas três linhagens poderão clarear o envolvimento de outros sistemas de neurotransmissão nas respostas comportamentais observadas no presente estudo.

O teste de CS e da BS tem o intuito de avaliar comportamentos do tipo-anedônico nos animais. Assim como o teste do NF, não há registro da comparação das fêmeas das linhagens isogênicas nestes testes, assim como nunca foram comparadas diretamente com a linhagem Wistar. O único trabalho que comparou animais machos das linhagens isogênicas nestes testes foi de Fadanni (2018). Neste estudo

prévio, o autor descreveu ausência de diferenças significativas entre as linhagens e ambas preferiram a solução de sacarose a água, corroborando com os achados deste trabalho. No entanto, foi descrito que os machos destas linhagens apresentam um maior consumo da solução de sacarose em relação às fêmeas.

No presente estudo foi observado que, quando comparadas com fêmeas da linhagem Wistar, ratas das linhagens isogênicas apresentam um maior consumo de sacarose, além disso, a linhagem Wistar não apresentou preferência por nenhuma das soluções. Este resultado vai de encontro com trabalhos presentes na literatura que demonstram que as fêmeas desta linhagem têm preferência pela solução de sacarose (MUKHERJEE et al., 2015; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ et al., 2015). Não foram observados efeitos da administração i.n. de MPTP sobre o consumo de sacarose nestas linhagens isogênicas (Figura 16), e também não há registros da realização deste teste em ratos em um protocolo de administração de MPTP. Contudo, a administração i.n. desta toxina reduziu o consumo de sacarose em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (SCHAMNE et al., 2018).

Este trabalho foi o primeiro a comparar fêmeas das linhagens isogênicas no teste da BS, onde observamos que a linhagem SLA16 apresenta uma redução no tempo de autolimpeza em relação às linhagens SHR e Wistar indicativo de um perfil tipo-anedônico. A diferença entre as fêmeas das linhagens isogênicas vai de encontro aos resultados na dissertação de Fadanni (2018), onde não foram observadas diferenças no tempo de autolimpeza entre machos das linhagens SHR e SLA16.

Não foram encontrados dados na literatura demonstrando o comportamento de Wistar fêmeas neste teste. Além disso, não se observou diferenças na latência para iniciar a auto limpeza nem no tempo de realização da mesma entre as linhagens wistar e SHR. Devido à diferença entre as duas no tempo de imobilidade no NF e à hipofunção dopaminérgica da linhagem SHR (RUSSEL et al., 1998; RUSSEL, 2002), seria esperado observar diferenças no tempo de auto limpeza entre as linhagens, com a linhagem SHR apresentando um perfil tipo-anedônico (tempo reduzido de autolimpeza).

Quando comparamos o comportamento das Wistar fêmeas no teste da BS com trabalhos que realizaram o teste em machos da mesma linhagem se observa que as fêmeas passam o dobro do tempo realizando a auto limpeza (MATHEUS, 2015; PESARICO et al., 2017).

Assim como o teste de CS de sacarose não há trabalhos na literatura que realizaram o teste da BS em um protocolo de

administração i.n. de MPTP em ratos. Não foram observadas alterações significativas em nenhum parâmetro do teste da BS nos grupos tratados com MPTP i.n. (Figura 18). Contudo, nosso grupo já demonstrou que a administração i.n. de 1 mg/narina de MPTP é capaz de induzir comportamento do tipo-anedônico em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (SCHAMNE et al., 2018).

A linhagem SHR é um modelo animal utilizado para o estudo do TDAH, sendo que já foi demonstrado que esta linhagem apresenta prejuízo na tarefa de reconhecimento de objeto, enquanto a linhagem Wistar discrimina o objeto novo (PIRES et al. 2009, 2010). Nossos resultados mostram que a linhagem Wistar reconhece o objeto novo, replicando os resultados da literatura, contudo, a linhagem SHR também discriminou os dois objetos, assim como a linhagem SLA16.

Os trabalhos de PIRES (2009, 2010) realizaram uma sessão de treino e teste de três minutos cada, enquanto que em nosso protocolo realizamos um treino de cinco minutos e o teste de três minutos. Possivelmente, um tempo mais prolongado para explorar os objetos durante a sessão de treino tenha facilitado o aprendizado da tarefa para as linhagens isogênicas. Outro trabalho que também realizou este teste com as linhagens isogênicas demonstrou que estas reconhecem o objeto novo, no entanto, neste trabalho os animais foram expostos aos objetos por um período ainda mais longo (10 minutos) (ANSELMi et al., 2016).

Quanto ao tempo de exploração dos objetos, estudos utilizando a linhagem SLA16 demonstram que esta apresenta hiperlocomção em situações novas, como observados no teste do CA, onde percorrem uma distância maior do que as demais linhagens (ANSELMi et al., 2016). E no teste de RO machos da linhagem SLA16 exploram por mais tempo os objetos do que a linhagem SHR (FADANNI, 2018). Nossos resultados corroboram com este perfil da linhagem, mostrando que as fêmeas da linhagem SLA16 também exploram mais os objetos na sessão de teste do que as demais linhagens presentes neste estudo (Figura 13A).

Não há registros na literatura demonstrando que a administração i.n. de MPTP cause um prejuízo na tarefa de RO em ratos da linhagem Wistar. Nossos resultados também mostram que a administração da toxina não altera a capacidade de fêmeas das linhagens Wistar, SHR e SLA16 em discriminar os objetos (Figura 13B). Contudo já foi demonstrado que a administração intra-SN de MPTP causa prejuízos na tarefa de RO 13 a 25 dias após a administração da toxina (SY et al., 2010; WANG et al., 2009). Neste trabalho realizamos o teste de RO 8 dias após a administração i.n. de MPTP, sendo que avaliações futuras em tempos mais tardios após a administração i.n. do MPTP são



importantes para descartar possíveis prejuízos no teste do RO nestas linhagens.

Os machos das linhagens SHR e SLA16 não apresentam prejuízos na memória de procedimento observada na versão modificada do labirinto aquático (GRANZOTTO, 2016). O presente trabalho foi o primeiro a avaliar as fêmeas desta linhagem nesta versão do labirinto aquático. A análise estatística não demonstrou diferenças entre as médias das linhagens a cada dia, corroborando com os trabalhos já publicados (Figura 17).

No entanto, quando observamos as médias de cada dia para as linhagens, percebemos que as linhagens Wistar e SLA16 que receberam solução veículo (i.n.) aprenderam a tarefa de encontrar a plataforma já no segundo dia de teste. Já o grupo SHR-veículo aprendeu a tarefa apenas no terceiro dia de teste. Este resultado corrobora com os trabalhos já realizados com esta linhagem que demonstram uma hipofunção dopaminérgica no estriado (região envolvida nesta tarefa) (RUSSELL et al., 1998; SAGVOLDEN, 2000; RUSSELL, 2002). Este resultado também mostra que a linhagem SHR requer uma maior número de sessões para aprender determinadas tarefas, assim como foi observado no teste de RO, onde um tempo de exposição maior na sessão de treino pode ter facilitado o reconhecimento do objeto novo.

Nosso grupo já demonstrou que a administração i.n. de 1 mg/narina de MPTP causa prejuízos na execução desta tarefa em ratos Wistar (PREDIGER et al. 2006, 2009). No entanto, nossos resultados com Wistar fêmeas contrastam a estes trabalhos, uma vez que não observamos prejuízo neste teste no grupo Wistar-MPTP. O que corrobora mais uma vez com a hipótese de que as fêmeas da linhagem Wistar seriam mais resistentes aos efeitos do MPTP i.n. quando comparadas aos machos da mesma linhagem.

O grupo SHR-MPTP também não apresentou prejuízo nesta tarefa, inclusive se manteve igual ao seu grupo controle, aprendendo a tarefa no terceiro dia de teste. Entretanto, o grupo SLA16-MPTP apresentou prejuízos na execução deste teste, e aprendeu a tarefa apenas no último dia de teste. Estes resultados são sugestivos de que o MPTP foi capaz de induzir prejuízos cognitivos nessa linhagem, prejudicando o aprendizado da tarefa.

Essa diferença na susceptibilidade ao efeito do MPTP observada na linhagem SLA16, mas não na linhagem SHR, pode estar relacionada as diferenças entre as linhagens na região genômica diferencial. Visto que trabalhos anteriores não mostraram diferenças dopaminérgicas entre as linhagens (OLIVEIRA, 2018).

Por fim analisamos a expressão de TH e DAT no estriado das três linhagens. A linhagem SHR já é conhecida por apresentar prejuízo no armazenamento de DA e maior expressão de DAT no CPF, estriado e núcleo accumbens, quando comparada ao seu controle genético, a linhagem wistar-Kyoto (RUSSELL, 2000, 2002; Sagvolden 2000).

Neste trabalho comparamos, primeiramente, a expressão de TH, enzima necessária na síntese de DA. Um trabalho recente demonstrou que comparado a linhagem Wistar, ratos machos da linhagem SHR apresentam maior expressão de TH no estriado (LEÃO et al., 2017). Nossos resultados obtidos em ratas contrastam com estes resultados prévio, uma vez que a análise estatística não revelou diferenças significantes entre as linhagens nos níveis de TH no estriado (Figura 19A). Contudo, deve ser destacado que as técnicas utilizadas nestes estudos foram diferentes. Em nosso trabalho quantificamos a expressão da proteína pela técnica de *western blotting*, enquanto o trabalho de LEÃO e colaboradores (2017) utilizou a técnica de imunohistoquímica e quantificou a expressão da proteína por densidade óptica.

Nosso grupo já demonstrou que a administração i.n. de MPTP leva a uma redução no imunoconteúdo de TH no estriado e na SNpc em ratos machos da linhagem Wistar (PREDIGER et al., 2006, 2009; MOREIRA et al., 2010). No entanto, o presente trabalho não observou alterações na expressão de TH no estriado 21 dias após a administração i.n. de MPTP em nenhuma linhagem.

Trabalhos utilizando a linhagem Wistar e SHR (machos) no modelo da reserpina demonstraram que ambas as linhagens apresentam redução de TH no estriado um dia após o protocolo e administração da reserpina (15 administrações de 0,1 mg/kg ao longo de 30 dias). Contudo, a linhagem SHR teve sua expressão de TH normalizada 15 dias após a última administração de reserpina, enquanto a linhagem Wistar não teve a mesma recuperação (LEÃO et al., 2017). Em conjunto, estes resultados nos levam a especular que alterações bioquímicas poderiam ser observadas nas linhagens isogênicas se analisadas em tempos mais precoces após a administração i.n. de MPTP.

Não há registros na literatura de trabalhos que tenham comparado diretamente a expressão de DAT em SHR e em Wistar. Os trabalhos que envolvem análises bioquímicas de SHR sempre o comparam com a linhagem Wistar Kyoto, a qual apresenta uma menor expressão do DAT em diversas regiões encefálicas, inclusive o estriado, em comparação a linhagem SHR (RUSSELL et al., 1998).

De maneira inesperada, observamos no presente estudo uma redução nos níveis estriatais de DAT em fêmeas da linhagem SHR em

comparação a linhagem Wistar (Figura 20B). Uma vez que o influxo do metabólito tóxico MPP<sup>+</sup> em neurônios dopaminérgicos ocorre via DAT, seria esperada uma maior resistência desta linhagem aos efeitos tóxicos do MPTP. Trabalhos futuros utilizando outras doses do MPTP i.n. e uma análise imunohistoquímica detalhada das alterações na via dopaminérgica nigroestriatal são necessárias para confirmar estas especulações.

## 9 CONCLUSÃO

O presente trabalho foi pioneiro em comparar as linhagens isogênicas SHR e SLA16 com a linhagem Wistar, e como resultados observamos que as linhagens SHR e SLA16 apresentam um menor perfil emocional tipo-ansioso em relação a linhagem Wistar, replicando o que já havia sido descrito em comparação a linhagem Lewis. Além disto, observamos que as linhagens isogênicas apresentam maior perfil tipo-depressivo quando comparadas a linhagem Wistar.

Foram observadas alterações sutis em relação aos efeitos comportamentais e bioquímicos induzidos pela administração i.n. do MPTP, o que pode estar relacionado a uma maior resistência de fêmeas em relação aos machos, sendo necessárias doses maiores de MPTP para a observação de resultados mais robustos. Apesar desta limitação, os resultados indicam que dentre as três linhagens, as fêmeas SLA16 foram as mais sensíveis aos efeitos da administração i.n. de MPTP, apresentando alterações no teste do nado forçado e prejuízo no labirinto aquático – versão de memória de procedimento. Estes resultados reforçam a hipótese de que a região genômica diferencial desta linhagem poderia influenciar nas alterações induzidas pelo MPTP, e demonstrando uma interação entre os fatores genéticos e ambientais em um modelo da DP.

## REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D., CREESE, B., POLITIS, M., CHAUDHURI, K.R., FFYTCH, D.H., WEINTRAUB, D., BALLARD, C. 2017. "Cognitive Decline in Parkinson Disease." *Nature Reviews Neurology* 13(4): 217–31. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2017.27>.
- AGUIAR, A.S., TRISTÃO, F.S.M., AMAR, M., CHEVARIN, C., LANFUMEY, L., MONGEAU, R., CORTI, O., PREDIGER, R.D., RAISMAN-VOZARI, R. 2013. "Parkin-Knockout Mice Did Not Display Increased Vulnerability to Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP)." *Neurotoxicity Research* 24(2): 280–87.
- ANDERSEN, J.K.. 2004. "Oxidative Stress in Neurodegeneration: Cause or Consequence?" *Nature Reviews Neuroscience* 10(7): S18.
- DOS ANJOS, P.A.R. "Fêmeas Das Linhagens SHR e SLA16: Um Modelo Genético Para o Estudo Dos Efeitos Do Etanol." .2017. 106p. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- ANSELM, M., CORREA, F.J., SANTOS, J.R., SILVA, A.F., CUNHA, J.A., LEÃO, A.H.F., CAMPÊLO, C.L.C., RIBEIRO, A.M., SILVA, R.H., IZÍDIO, G.S. 2016. "Genetic Evidence for Chromosome 4 Loci Influencing Learning and Memory." *Neurobiology of Learning and Memory* 131: 182–91.
- ANTZOULATOS, E., JAKOWEC, M.W., PETZINGER, G.M., WOOD, R.I. 2011. "Sex Differences in Motor Behavior in the Mptp Mouse Model of Parkinson's Disease." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 95(4): 466–72.
- BABA, T., TAKEDA, A., KIKUCHI, A., NISHIO, Y., HOSOKAI, Y., HIRAYAMA, K., HASEGAWA, T., SUGENO, N., SUZUKI, K., MORI, E., TAKAHASHI, S., FUKUDA, H., ITOYAMA, Y. 2011. "Association of Olfactory Dysfunction and Brain Metabolism in Parkinson's Disease." *Movement Disorders* 26(4): 621–28.
- BARAKA, A.M., KORISH, A.A., SOLIMAN, G.A., KAMAL, H. 2011. "The Possible Role of Estrogen and Selective Estrogen Receptor Modulators in a Rat Model of Parkinson's Disease." *Life Sciences* 88(19–

20): 879–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.03.010>.

BARHAM, K.J., MASTERS, C.L., BUSH, A.I. 2004. “Neurodegenerative Diseases and Oxidative Stress.” *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 205–14.

BERGER, D., SAGVOLDEN, G. 1998. “Sex Differences in Operant Discrimination Behaviour in an Animal Model of Attentional-Deficit Hyperactivity Disorder.” *Behavioural Brain Research* 94: 73–82.

BEZARD, E., GROSS, C.E., FOURNIER, M-C., DOVERO, S., BLOCH, B., JABER, M. 1999. “Absence of MPTP-Induced Neuronal Death in Mice Lacking the Dopamine Transporter.” *Experimental Neurology* 155(2): 268–73.

BOSBOOM, J.L.W., STOFFERS, D., WOLTERS, E.C. 2004. “Cognitive Dysfunction and Dementia in Parkinson’s Disease.” *Journal of Neural Transmission* 111(10–11): 1303–15.

BOURQUE, M., DLUZEN, D.E., DI PAOLO, T. 2009. “Neuroprotective Actions of Sex Steroids in Parkinson ’ s Disease.” *Frontiers in Neuroendocrinology* 30(2): 142–57.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.04.014>.

BOURQUE, M., DLUZEN, D.E., DI PAOLO, T. 2011. “Male / Female Differences in Neuroprotection and Neuromodulation of Brain Dopamine.” *Frontiers in Neuroendocrinology* 2(September): 1–16.

BRAAK, H., TREDICI, K.D., RÜB, U., DE VOS, R.A.I., STEUR, E.N.H.J., BRAAK, E. 2003. “Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson’s Disease.Pdf.” *Neurobiology of Aging* 24: 197–211.

BROWN, R.G., LANDAU, S., HINDLE, J.V., PLAYFER, J., SAMUEL, M., WILSON, K.C., HURT, C.S., ANDERSON, R.J., CARNELL, J., DICKINSON, L., GIBSON, G., VAN SCHAICK, R., SELLWOOD, K., THOMAS, B.A., BURN, D.J. 2011. “Depression and Anxiety Related Subtypes in Parkinson’s Disease.” *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 82(7): 803–9.

CARLSSON, A. 1959. “The Occurrence,, Distribution and Physiolocial Role of Catecholamines in the Nervous System.” *Symposium of Catecholamines*: 490–93.

CARLSSON, A., LINDQVIST, M., MAGNUSSON, T. 1957. “3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists.” *Nature* 180.

CASTRO, A.A., GHISONI, K., LATINI, A., QUEVEDO, J., TASCA, C.I., PREDIGER, R.D.S. 2012. “Lithium and Valproate Prevent Olfactory Discrimination and Short-Term Memory Impairments in the Intranasal 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP) Rat Model of Parkinson’s Disease.” *Behavioural Brain Research* 229(1): 208–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.01.016>.

CHAUDHURI, K.R., HEALY, D.G., SCHAPIRA, A.H.V. 2006. “Non-Motor Symptoms of Parkinson’s Disease.” *Lancet Neurology* 5(March): 235–45.

CHÁVEZ, A.M.V. “Influência de Uma Região Do Cromossomo 4 Do Rato No Metabolismo e Memória.”. 2017. 127p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CHIAVEGATTO, S., IZIDIO, G.S., MENDES-LANA, A., ANEAS, I., FREITAS, T.A., TORRÃO, A.S., CONCEIÇÃO, I.M., BRITTO, L.R.G., RAMOS, A. 2009. “Expression of  $\alpha$ -Synuclein Is Increased in the Hippocampus of Rats with High Levels of Innate Anxiety.” *Molecular Psychiatry* 14(9): 894–905.

CORVINO, M.E. “Investigação Da Participação Do Receptor Dopaminérgico D2 Nas Diferenças Comportamentais, Relacionadas à Ansiedade/Emocionalidade, Das Linhagens SHR e SLA16.”. 2015. 91p. Dissertação. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CRYAN, J.F., MARKOU, A., LUCKI, I. 2002. “Assessing Antidepressant Activity in Rodents: Recent Developments and Future Needs.” *Trends in Pharmacological Sciences* 23(5): 238–45.

DALLÉ, E., MABANDLA, M.V. 2018. “Early Life Stress , Depression And Parkinson’s Disease : A New Approach.” *Molecular Brain*: 1–13.

DAUER, W., PRZEDBORSKI, S. 2003. “Parkinson’s Disease : Mechanisms and Models.” *Neuron* 39: 889–909.

DAWSON, T.M., GOLDE, T.E., LAGIER-TOURENNE, C. 2018. "Animal Models of Neurodegenerative Diseases." *Nature Neuroscience*. <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0236-8>.

DETKE, M.J., LUCKI, I. 1996. "Detection of Serotonergic and Noradrenergic Antidepressants in the Rat Forced Swimming Test: The Effects of Water Depth." *Behavioural Brain Research* 73: 43–46.

DETKE, M.J., RICKELS, M., LUCKI, I. 1995. "Active Behaviors in the Rat Forced Swimming Test Differentially Produced by Serotonergic and Noradrenergic Antidepressants." *Psychopharmacology*: 66–72.

DEVI, L., RAGHAVENDRAN, V., PRABHU, B.M., AVADHANI, N.G., ANANDATHEERTHAVARADA, H.K. 2008. "Mitochondrial Import and Accumulation of  $\alpha$ -Synuclein Impair Complex I in Human Dopaminergic Neuronal Cultures and Parkinson Disease Brain." *Journal of Biological Chemistry* 283(14): 9089–9100.

DIAS, V., JUNN, E., MOURADIAN, M.M. 2013. "The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease." *Journal of Parkinson's Disease* 3(4): 461–91.

DLUZEN, D.E., MCDERMOTT, J.L., LIU, B. 1996. "Estrogen as a Neuroprotectant against MPTP-Induced Neurotoxicity in C57/B1 Mice." *Neurotoxicology and Teratology* 18(5): 603–6.

DOTY, R.L. 2008. "The Olfactory Vector Hypothesis of Neurodegenerative Disease: Is It Viable?" *Annals of Neurology* 63(1): 7–15.

EBERHARDT, O., SCHULZ, J.B. 2003. "Apoptotic Mechanisms and Antiapoptotic Therapy in the MPTP Model of Parkinson's Disease." *Toxicology Letters* 139(2–3): 135–51.

ENGELHARDT, E., GOMES, M.M. 2017. "Lewy and His Inclusion Bodies: Discovery and Rejection." *Dementia & Neuropsychologia* 11(2): 198–201. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1980-57642017000200198&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1980-57642017000200198&lng=en&tlng=en).

ENNACEUR, A., DELACOUR, J. 1988. "A New One-Trial Test for Neurobiological Studies of Memory in Rats. III. Spatial vs. Non-Spatial Working Memory." *Behavioural Brain Research* 51(1): 83–92.



FADANNI, G.P. “Prejuízos Motores Induzidos Por Administração Repetida e Baixa Dose de Reserpina e a Participação de Uma Região Do Cromossomo 4 Do Rato (*Rattus Novergicus*).”. 2016. 58p. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

———. “Efeitos Comportamentais e Neuroquímicos Induzidos Pela Injeção Bilateral de 6-Hidroxidopamina No Estriado de Ratos Das Linhagens SHR e SLA16.”. 2018. 137p. Dissertação. Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GAINETDINOV, R.R., FUMAGALLI, F., JONES, S..R., CARON, M.G. 1977. “Dopamine Transporter Is Required for In Vivo MPTP Neurotoxicity: Evidence from Mice Lacking the Transporter.” *Journal of Neurochemistry* 69(3): 1322–25. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.1997.69031322.x>.

GAINETDINOV, R.R., FUMAGALLI, F., WANG, Y-M., JONES, S.R., LEVEY, A.I., MILLER, G.W., CARON, M.G. 1998. “Increased MPTP Neurotoxicity in Vesicular Monoamine Transporter 2 Heterozygote Knockout Mice.” *Journal of Neurochemistry* 70(5): 1973–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9572281>.

GAKI, G.S, PAPAVALASSIOU, G.S. 2014. “Oxidative Stress-Induced Signaling Pathways Implicated in the Pathogenesis of Parkinson’s Disease.” *NeuroMolecular Medicine* 16(2): 217–30.

GHATAK, S., TRUDLER, D., DOLATABADI, N., AMASUDHAM, R. 2018. “Parkinson ’ s Disease : What the Model Systems Have Taught Us so Far.” *Journal of Genetics* 97(3): 729–51.

GOETZ, C.G. 1986. “Charcot on Parkinson ’ s Disease.” 1(1): 27–32.

———. 2011. “The History of Parkinson’s Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies.” *Spring*.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T. 2010. “Vulnerability of Mesostriatal Dopaminergic Neurons in Parkinson’s Disease.” *Frontiers in Neuroanatomy* 4(October): 1–14. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2010.00140/abstract>.

GOSWAMI, P., JOSHI, N., SINGH, S. 2017. “Neurodegenerative

Signaling Factors and Mechanisms in Parkinson's Pathology.” *Toxicology in Vitro* 43(December 2016): 104–12.

GRANZOTTO, N. “Efeitos Farmacogenéticos Do Ratamento Com Cafeína Em Ratos Isogênicos SHR e SLA16.”. 2016. 104p. Dissertação. Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GUBELLINI, P., KACHIDIAN, P. 2015. “Animal Models of Parkinson ' s Disease: An Updated Overview ` Les Animaux de La Maladie de Parkinson: Un Panorama Mode Actualise.” *Revue Neurologique*: 1–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurol.2015.07.011>.

HINOJOSA, F.R., SPRICIGO, L., IZIDIO, G.S., BRÜSKE, G.R., LOPES, D.M., RAMOS, A. 2006. “Evaluation of Two Genetic Animal Models in Behavioral Tests of Anxiety and Depression.” *Behavioural Brain Research* 168(1): 127–36.

HÖGLINGER, G.U., ALVAREZ-FISHER, D., ARIAS-CARRIÓN, O., DJUFRI, M., WINDOLPH, A., KEBER, U., BORTA, A., RIES, V., SCHWARTING, R.K.W., SCHELLER, D., OERTEL, W.H. 2015. “A New Dopaminergic Nigro-Olfactory Projection.” *Acta Neuropathologica* 130(3): 333–48.

ISINGRINI, E., CAMUS, V., LE GUIQUET, A-M., PINGAUD, M., DEVERS, S., BELZUNG, C. 2010. “Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice.” *PLoS ONE* 5(4).

JIANG, P., DICKSON, D.W. 2017. “Parkinson ' s Disease: Experimental Models and Reality.” *Acta Neuropathologica* (0123456789).

JONIEC, I., CIESIELSKA, A., KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I., PRZYBYLKOWSKI, A., CZLONKOWSKA, A., CZLONKOWSKI, A. 2009. “Age- and Sex-Differences in the Nitric Oxide Synthase Expression and Dopamine Concentration in the Murine Model of Parkinson's Disease Induced by 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine.” *Brain Research* 1261: 7–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.12.081>.

JURADO-CORONEL, J.C., CABEZAS, R., RODRÍGUEZ, M.F.A., ECHEVERRÍA, V., GARCÍA-SEGURA, L.M., BARRETO, G.E. 2017. “Sex Differences in Parkinson's Disease: Features on Clinical Symptoms,

Treatment Outcome, Sexual Hormones and Genetics.” *Frontiers in Neuroendocrinology* 50(September): 18–30.

KOKRAS, N., ANTONIOU, K., MIKAIL, H.G., KAFETZOPOULOS, V., PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z., DALLA, C. 2015. “Neuropharmacology Forced Swim Test : What about Females ?” *Neuropharmacology* (April): 1–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.016>.

LANG, A.E., OBESO, J.A. 2004. “Challenges in Parkinson’s Disease: Restoration of the Nigrostriatal Dopamine System Is Not Enough.” *Lancet Neurology* 3(5): 309–16.

LEÃO, A.H.F.F., SARMENTO-SILVA, A.J., SANTOS, J.R., RIBEIRO, A.M., SILVA, R.H. 2015. “Molecular , Neurochemical , and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson ’ s Disease : New Perspectives to a Long-Standing Model.” *Brain Pathology*.

LEÃO, A.H.F.F., MEURER, Y.S.R., DA SILVA, A.F., MEDEIROS, A., CAMPÊLO, C.L.C., ABÍLIO, V.C., ENGELBERTH, R.C.G.K., CAVALCANTE, J.S., IZIDIO, G.S., RIBEIRO, A.M., SILVA, R.H. 2017. “Spontaneously Hypertensive Rats ( SHR ) Are Resistant to a Reserpine-Induced Progressive Model of Parkinson ’ s Disease : Differences in Motor Behavior , Tyrosine Hydroxylase and  $\alpha$  -Synuclein Expression.” 9(March): 1–13.

LEES, A.J., SELIKHOVA, M., ANDRADE, L.A., DUYCKAERTS, C. 2008. “The Black Stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff.” *Movement Disorders* 23(6): 777–83.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. 1951. “Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.” *Journal of Biological Chemistry* 193: 265–75.

MARTINEZ-MARTIN, P. 2014. “Nonmotor Symptoms and Health-Related Quality of Life in Early Parkinson’s Disease.” *Movement Disorders* 29(2): 166–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375626>.

MASILAMONI, G.J., SMITH, Y. 2018. “Chronic MPTP Administration Regimen in Monkeys : A Model of Dopaminergic and Non-Dopaminergic Cell Loss in Parkinson ’ s Disease.” *Journal of Neural Transmission* 125(3): 337–63.

MATHEUS, F.C., AGUIAR, A.S., CASTRO, A.A., VILLARINHO, J.G., FERREIRA, J., FIGUEIREDO, C.P., WALZ, R., SANTOS, A.R.S., TASCA, C.I., PREDIGER, R.D.S. 2012. “Neuroprotective Effects of Agmatine in Mice Infused with a Single Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP).” *Behavioural Brain Research* 235(2): 263–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.017>.

———. “Dissociando Anedonia e Outros Sintomas Da Depressão Na Doença de Parkinson Em Um Modelo Experimental Em Ratos: Papel Do Estriado Dorsolateral e Do Córtex Pré-Frontal.”. 2015. 179p. Tese. Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DE MEDEIROS, G.F., PEREIRA, E., GRANZOTTO, N., RAMOS, A. 2013. “Low-Anxiety Rat Phenotypes Can Be Further Reduced through Genetic Intervention.” *PLoS ONE* 8(12).

DE MEDEIROS, CORRÊA, F.J., CORVINO, M.E., IZIDIO, G.S., RAMOS, A. 2014. “The Long Way from Complex Phenotypes to Genes: The Story of Rat Chromosome 4 and Its Behavioral Effects.” *World Journal of Neuroscience* 4(June): 203–15.

MILLER, D.B., ALI, S.F., O'CALLAGHAN, J.P., LAWS, S.C. 1998. “The Impact of Gender and Estrogen on Striatal Dopaminergic Neurotoxicity.” *Annals New York Academy of Sciences* 39(5): 153–65.

MISIAK, M., BEYER, C., ARNOL, S. 2010. “Gender-Specific Role of Mitochondria in the Vulnerability of 6-Hydroxydopamine-Treated Mesencephalic Neurons.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1797(6–7): 1178–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.04.009>.

MITRA, S., CHAKRABARTI, N., DUTTA, S.S., RAY, S., BHATTACHARYA, P., SINHA, P., BHATTACHARYYA, A. 2015. “Gender-Specific Brain Regional Variation of Neurons, Endogenous Estrogen, Neuroinflammation and Glial Cells during Rotenone-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease.” *Neuroscience* 292: 46–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.052>.

MORE, S.V., KUMAR, H., CHO, D-Y., YUN, Y-S., CHOI, D-G. 2016. “Toxin-Induced Experimental Models of Learning and Memory Impairment.” *International Journal of Molecular Sciences* 17(9).

MOREIRA, E.L.G., RIAL, D., AGUIAR, A.S., FIGUEIREDO, C.P., SIQUEIRA, J.M., DALBÓ, A., HORST, H., OLIVEIRA, J., MANCINI, G., SANTOS, T.S., VILLARINHO, J.G., PINHEIRO, F.V., MARINO-NETO, J., FERREIRA, J., DE BEM, A.F., LATINI, A., PIZZOLATTI, M.G., RIBEIRO-DO-VALLE, R.M., PREDIGER, R.D.S. 2010. “Proanthocyanidin-Rich Fraction from Croton Celtidifolius Baill Confers Neuroprotection in the Intranasal 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Rat Model of Parkinson’s Disease.” *Journal of Neural Transmission* 117(12): 1337–51.

MUKHERJEE, S., SEM, S., BISWAS, A., BARMAN, T.K., TRIPATHI, S.K. 2015. “Impact on Behavioral Changes Due to Chronic Use of Sertraline in Wistar Albino Rats.” *Indian Journal of Pharmacology* 47(6): 657–62.

NIRANJAN, R. 2014. “The Role of Inflammatory and Oxidative Stress Mechanisms in the Pathogenesis of Parkinson’s Disease: Focus on Astrocytes.” *Molecular Neurobiology* 49(1): 28–38.

OLIVEIRA, R.B. “Estudo Da Alfa-Sinucleína e Do Sistema Dopaminérgico Nas Linhagens de Ratos Isogênicas SHR e SLA16.”. 2018. 80p. Dissertação. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OOKUBO, M., YOKOYAMA, H., KATO, H., ARAKI, T. 2009. “Gender Differences on MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine) Neurotoxicity in C57BL/6 Mice.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 311(1–2): 62–68.

PARKINSON, J. 2002. “An Essay on the Shaking Palsy.” *Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences* 14: 223–36.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E, BRILEY, M. 1985. “Validation of Open: Closed Arm Entries in an Elevated plus-Maze as a Measure of Anxiety in the Rat.” *Journal of Neuroscience Methods* 14(3): 149–67.

PEREIRA, E. “Desenvolvimento de Uma Linhagem Congênica Para Um Locus No Cromossomo 4 Do Rato Com Efeito Sobre a Emocionalidade.”. 2010. 164p. Tese. Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PESARICO, A.P., ROSA, S.G., STANGHERLIN, E.C., MANTOVANI,

A.C., ZENI, G., NOGUEIRA, C.W. 2017. “7-Fluoro-1, 3-Diphenylisoquinoline-1-Amine Reverses the Reduction in Self-Care Behavior Induced by Maternal Separation Stress in Rats by Modulating Glutamatergic / GABAergic Systems.” *Journal of Psychiatric Research* 89: 28–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.01.013>.

PICILLO, M., AMBONI, M., ERRO, R., LONGO, K., VITALE, C., MOCCIA, M., PIERRO, A., SANTANGELO, G., DE ROSA, A., DE MICHELE, G., SANTORO, L., OREFICE, G., BARONE, P., PELLECCIA, M.T. 2013. “Gender Differences in Non-Motor Symptoms in Early, Drug Naïve Parkinson’s Disease.” *Journal of Neurology* 260(11): 2849–55.

PICILLO, M., NICOLETTI, A., FETONI, V., GARAVAGLIA, B., BARONE, P., PELLECCIA, M.T. 2017. “The Relevance of Gender in Parkinson’s Disease: A Review.” *Journal of Neurology* 264(8): 1583–1607.

PIRES, V.A., PAMPLONA, F.A., PANDOLFO, P., FERNANDES, D., PREDIGER, R.D.S., TAKAHASHI, R.N. 2009. “Adenosine Receptor Antagonists Improve Short-Term Object-Recognition Ability of Spontaneously Hypertensive Rats : A Rodent Model of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder.” *Behavioural Pharmacology* 20(2): 134–45.

PIRES, V.S., PAMPLONA, F.A., PANDOLFO, P., PREDIGER, R.D.S., TAKAHASHI, R.N. 2010. “Chronic Caffeine Treatment during Prepubertal Period Confers Long-Term Cognitive Benefits in Adult Spontaneously Hypertensive Rats ( SHR ), an Animal Model of Attention Deficit Hyperactivity Disorder ( ADHD ).” *Behavioural Brain Research* 215(1): 39–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.06.022>.

POEWE, W., SEPPI, K., TANNER, C.M., HALLIDAY, G.M., BRUNDIN, P., VOLKMANN, J., SCRAG, A-E. LANG, A.E. 2017. “Parkinson Disease.” *Nature Reviews Disease Primers* 3: 1–21.

PORSOLT, R.D., LE PICHON, M., JALFRE, M. 1977. “Depression: A New Animal Model Sensitive to Antidepressant Treatments.” *Nature* 267: 192–93.

POSTUMA, R.B., BERG, D. 2016. “Advances in Markers of Prodromal Parkinson Disease.” *Nature Reviews Neurology* 12(11): 622–34.

POTHION, S., BIZOT, J.C., TROVERO, F., BELZUNG, C. 2004. “Strain

Differences in Sucrose Preference and in the Consequences of Unpredictable Chronic Mild Stress.” *Behavioural Brain Research* 155(1): 135–46.

PREDIGER, R.D.S., BATISTA, L.C., MEDEIROS, R., PANDOLFO, P., FLORIO, J.C., TAKAHASHI, R.N. 2006. “The Risk Is in the Air: Intranasal Administration of MPTP to Rats Reproducing Clinical Features of Parkinson’s Disease.” *Experimental Neurology* 202(2): 391–403.

PREDIGER, R.D.S., RIAL, D., MEDEIROS, R., FIGUEIREDO, C.P., DOTY, R.L., TAKAHASHI, R.N. 2009. “Risk Is in the Air: An Intranasal MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6- Tetrahydropyridine) Rat Model of Parkinson’s Disease.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170: 629–36.

PREDIGER, R.D.S., AGUIAR, A.S., ROJAS-MAYORQUIN, A.E., FIGUEIREDO, C.P., MATHEUS, F.C., GINESTET, L., CHEVARIN, C., DEL BEL, E., MONGEAU, R., HAMON, L., LANFUMEY, L. RAISAN-VOZARI, R. 2009. “Single Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6- Tetrahydropyridine in C57BL/6 Mice Models Early Preclinical Phase of Parkinson’s Disease.” *Neurotoxicity Research* 17(2): 114–29.

PREDIGER, R.D.S., AGUIAR, A.S., MOREIRA, E.L.G., MATHEUS, F.C., CASTRO, A.A., DE BEM, A.F., LATINI, A., TASCA, C.I., FARINA, M., RAISMAN-VOZARI, R. 2011. “The Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP): A New Rodent Model to Test Palliative and Neuroprotective Agents for Parkinson’s Disease.” *Current Pharmaceutical Design* 17(5): 489–507. <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&iissn=1381-6128&volume=17&issue=5&page=489>.

PREDIGER, R.D.S., MATHEUS, F.C., SCWARZBOLD, M.L., LIMA, M.M.S., VITAL, M.A.B.F. 2012. “Anxiety in Parkinson’s Disease: A Critical Review of Experimental and Clinical Studies.” *Neuropharmacology* 62(1): 115–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.039>.

PRZEDBORSKI, S. 2017. “The Two-Century Journey of Parkinson Disease Research.” *Nature Reviews Neuroscience* 18(4): 251–59. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2017.25>.

RAMOS, A., MELLERIN, Y. MORMÈDE, P., CHAOULOFF, F. 1998. “A

Genetic and Multifactorial Analysis of Anxiety-Related Behaviours in Lewis and SHR Intercrosses.” *Behavioural Brain Research* 96(1–2): 195–205.

RAMOS, A., MOISAN, M-P., CHAOULOFF, F., MORMÈDE, P. 1999. “Identification of Female-Specific QTLs Affecting an Emotionality-Related Behavior in Rats.” *Molecular Psychiatry* 4(5): 453–62.

ROJO, A.I., MONTERO, C., SALAZAR, M., CLOSE, R.M., FERNÁNDEZ-RUIZ, J., SHANCHEZ-GONZÁLEZ, M.A., SAGARRA, M.R., JACKSON-LEWIS, V., CAVADA, C., CUADRADO, A. 2006. “Persistent Penetration of MPTP through the Nasal Route Induces Parkinson’s Disease in Mice.” *European Journal of Neuroscience* 24(7): 1874–84.

RUSSELL, V., VILLIERS, A., SAGVOLDEN, T., LAMM, M., TALJAARD, J. 1998. “Differences between Electrically-, Ritalin- and Amphetamine-Stimulated Release of [3H]Dopamine from Brain Slices Suggest Impaired Vesicular Storage of Dopamine in an Animal Model of Attentional- Deficit Hyperactivity Disorder.” *Behavioural Brain Research* 94: 163–71.

RUSSELL, V.A. 2000. “The Nucleus Accumbens Motor-Limbic Interface of the Spontaneously Hypertensive Rat as Studied in Vitro by the Superfusion Slice Technique.” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24(1): 133–36.

RUSSELL, V.A. 2002. “Hypodopaminergic and Hypernoradrenergic Activity in Prefrontal Cortex Slices of an Animal Model for Attention-Deficit Hyperactivity Disorder - -- the Spontaneously Hypertensive Rat.” *Behavioral Brain Research* 130(1–2): 191–96.

SAGVOLDEN, T. 2000. “Behavioral Validation of the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) as an Animal Model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (AD/HD).” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24(1): 31–39.

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, D., POON, A.N., KUBANT, R., KIM, H., HUOZ, P.S.P., CHO, C.E., PANNIA, E., REZA-LÓPEZ, S.A., PAUSOVA, Z., BAZINET, R.P. ANDERSON, G.H. 2015. “High Vitamin A Intake during Pregnancy Modifies Dopaminergic Reward System and Decreases Preference for Sucrose in Wistar Rat Offspring ☆.” *The Journal of*



Nutritional

Biochemistry:

8–15.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnuthbio.2015.08.020>.

SANTARELLI, L., SAXE, M., GROSS, C., SURGET, A., BATTAGLIA, F., DULAWA, S., WEISSTAUB, N., LEE, J., DUMAN, R., ARANCIO, O., BELZUNG, C., HEN, R. 2003. “Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants.” *Science* 301(5634): 805–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907793>.

SANTOS, J.R., CUNHA, J.A.S., DIERSCHNABEL, A.L., CAMPÊLO, C.L.C., LEÃO, A.H.F.F., SILVA, A.F., ENGELBERTH, R.C.G.J., IZIDIO, G.S., CAVALCANTE, J.S., ABÍLIO, V.C., RIBEIRO, A.M., SILVA, R.H. 2013. “Cognitive, Motor and Tyrosine Hydroxylase Temporal Impairment in a Model of Parkinsonism Induced by Reserpine.” *Behavioural Brain Research* 253: 68–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.031>.

SAUNDERS-PULLMAN, R. 2003. “Estrogens and Parkinson Disease.” *Endocrine* 21(1): 81–87. <http://www.springerlink.com/index/H30NQ11235362322.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/FAA7D1AE-B5DA-432F-A078-9ADFD7FE7AAFE>.

SCHAMNE, M.G., MACK, J.M. MORETTI, M., MATHEUS, F.C., WALZ, R., LANFUMEY, L., PREDIGER, R.D. 2018. “The Gender-Biased Effects of Intranasal MPTP Administration on Anhedonic- and Depressive-Like Behaviors in C57BL/6 Mice: The Role of Neurotrophic Factors.” *Neurotoxicity Research*: 1–12.

SCHAPIRA, A.H.V., COOPER, J.M., DEXTER, D., CLARK, J.B., JENNER, P., MARSDEN, C.D. 1989. “Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson’s Disease.” *The Lancet* 333(8649): 1269.

SCHAPIRA, A.H.V., CHAUDHURI, K.R., JENNER, P. 2017. “Non-Motor Features of Parkinson Disease.” *Nature Reviews Neuroscience* 18(7): 435–50. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2017.62>.

SCHMIDT, N., FERGER, B. 2001. “Neurochemical Findings in the MPTP Model of Parkinson’s Disease.” *Journal of Neural Transmission* 108(11): 1263–82.

SHULTS, C.W. 2006. “Lewy Bodies.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(6): 1661–68. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0509567103>.

SIANI, F. GRECO, R., LEVANDIS, G., GHEZZI, C., DAVIDDI, F., DEMARTINI, C., VEGETO, E., FUZZTI-ARMENTERO, M-T., BLANDINI, F. 2017. "Influence of Estrogen Modulation on Glia Activation in a Murine Model of Parkinson's Disease." *Frontiers in Neuroscience* 11(MAY): 1–11.

SMEYNE, R.J., JACKSON-LEWIS, V. 2005. "The MPTP Model of Parkinson's Disease." *Molecular Brain Research* 134(1): 57–66.

SURMEIER, D.J., GUZMAN, J.N., SANCHEZ-PADILLA, J., SCHUMACKER, P.T. 2011. "The Role of Calcium and Mitochondrial Oxidant Stress in the Loss of Substantia Nigra Pars Compacta Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease." *Neuroscience* 198: 221–31.

SY, H-N., WU, S-L., WANG, W-F., CHEN, C-H., HUANG, Y-T., LIOU, Y-M., CHIOU, C-S., PAWLAK, C.R., HO, Y-J. 2010. "MPTP-Induced Dopaminergic Degeneration and Deficits in Object Recognition in Rats Are Accompanied by Neuroinflammation in the Hippocampus." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 95(2): 158–65.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2009.12.020>.

THOBOIS, S., PRANGE, S., SGAMBATO-FAURE, V., TREMBLAY, L., BROUSSOLLE, E. 2017. "Imaging the Etiology of Apathy, Anxiety, and Depression in Parkinson's Disease: Implication for Treatment." *Current Neurology and Neuroscience Reports* 17(10).

TRISTÃO, F.S.M., AMAR, M., LATROUS, I., DEL-BEL, E.A., PREDIGER, R.D., RAISMAN-VOZARI, R. 2014. "Evaluation of Nigrostriatal Neurodegeneration and Neuroinflammation Following Repeated Intranasal 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP) Administration in Mice, an Experimental Model of Parkinson's Disease." *Neurotoxicity Research* 25(1): 24–32.

VILA, M., PRZEDBORSKI, S. 2003. "Targeting Programmed Cell Death in Neurodegenerative Diseases." *Nature Reviews Neuroscience* 4(5): 365–75.

WANG, W-F., WU, S-L., LIOU, Y-M., WANG, A-L. PAWLAK, C.R., HO, Y-L. 2009. "MPTP Lesion Causes Neuroinflammation and Deficits in Object Recognition in Wistar Rats." *Behavioral Neuroscience* 123(6): 1261–70.

WATANABE, Y., FUJITA, M., ITO, Y., OKADA, T., K, H., NISHIMURA, T. 1997. "Brain Dopamine Transporter in Spontaneously Hypertensive Rats." *The Journal of Nuclear Medicine* 38(5): 5–6.

YADAV, S.K., PANDEY, S., SINGH, B. 2017. "Role of Estrogen and Levodopa in 1-Methyl-4-Phenyl-1, 2, 3, 6-Tetrahydropyridine (Mptp)-Induced Cognitive Deficit in Parkinsonian Ovariectomized Mice Model: A Comparative Study." *Journal of Chemical Neuroanatomy* 85: 50–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.07.002>.

ZHU, K., VAN HILTEN, J.J., MARINUS, J. 2017. "Onset and Evolution of Anxiety in Parkinson's Disease." *European Journal of Neurology* 24(2): 404–11.